

Vergleichende quantitative Bestimmungen von Lp(a)-Lipoprotein im Humanserum mit zwei verschiedenen Techniken

Raketenimmunelektrophorese RIE und Zonen-Immunelektrophorese-Assay ZIA

I. Berger und G. Ohlenschläger

Zusammenfassung:

Quantitative Lp(a)-Bestimmungen im Humanserum wurden mit zwei unterschiedlichen immunoelektrophoretischen Techniken – der Raketenimmunelektrophorese (RIE) und dem Zonen-Immunelektrophorese-Assay (ZIA) durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigte im Bereich von 6–80 mg/dl eine gute Übereinstimmung ($r = 0,9919$).

Lp(a)-Konzentrationen unter 6 mg/dl können mit der Raketen-Technik nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden, da nach Laurell (12) Präzipitathöhen kürzer als 5 mm nicht mehr proportional zur Konzentration des Antigens sind.

Bei dem ZIA dagegen können Lp(a)-Konzentrationen von 1–6 mg/dl noch gut und reproduzierbar nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter:

Lp(a)-Lipoproteinbestimmungen – Raketenimmunelektrophorese – Zonen-Immunelektrophorese-Assay

Summary:

Quantitative determinations of Lp(a)-lipoprotein had been performed by two different techniques – rocket immunoelectrophoresis and zone immunoelectrophoresis assay. A significant correlation was found between data of these two methods in a range of 6–80 mg/dl.

Quantitative determinations of Lp(a) below 6 mg/dl could not be carried out by the rocket method, since precipitation peaks below 5 mm are no longer proportional to the concentration of the antigen (12).

Using ZIA, Lp(a)-concentrations of 1–6 mg/dl can be determined in a quantitatively reproducible manner.

Keywords:

Lp(a)-lipoprotein determinations – Rocket immunoelectrophoresis – Zone immunoelectrophoresis assay

Einleitung

Lp(a) mit einem Molekulargewicht von $5,4 \times 10^6$ Dalton ist ein cholesterinreiches Lipoprotein, dessen Lipidzusammensetzung mit der LDL (low density lipoprotein)-Fraktion nahezu identisch ist (8).

Die Hauptprotein Komponente von Lp(a) ist Apolipoprotein B. Lp(a) jedoch enthält zusätzlich ein spezifisches Lp(a)-Antigen. Zwischen der Lp(a)- und ApoB-Konzentration im Humanserum besteht keine Korrelation (2).

Seit man erkannt hat, daß zwischen der Lp(a)-Konzentration und dem Auftreten koronarer Gefäßerkrankungen ein Zusammenhang besteht (2, 3, 6, 7) gewinnt das Lp(a) zunehmend an Bedeutung.

Eine erhöhte Lp(a)-Konzentration wird nach Kostner (10) als eigenständiger, zusätzlicher Risikofaktor für die Entstehung eines Myokardinfarktes angesehen.

Die mittlere Serumkonzentration beträgt 10–20 mg/dl (9). Bei kardio-vaskulären Erkrankungen können Lp(a)-Werte bis zu 250 mg/dl gefunden werden (9). Eine Lp(a)-Konzentration über 30 mg/dl bedeutet bereits ein Risiko für die Entstehung eines Myokardinfarktes (10).

Mit einfachen immunchemischen Techniken wie der radialen Immundiffusion RID war es zunächst möglich, das Lp(a) quantitativ zu bestimmen (1). Da aber die Lp(a)-Konzentration in den meisten Humanseren geringer ist als die untere Nachweisgrenze dieser Methode, ist sie für eine exakte quantitative Lp(a)-Bestimmung nicht geeignet.

Eine empfindlichere quantitative Nachweismethode wurde von Albers (2) mit dem Radioimmunoassay entwickelt. Mit dieser Methode kann das Lp(a) auch in Seren nachgewiesen werden, die bei der Bestimmung mit der radialen Immundiffusion als negativ gelten.

Besonders geeignet für die Quantifizierung von Lp(a) ist die zuerst von Laurell (11) beschriebene Raketenimmunelektrophorese (4, 10) und der von Vesterberg (15) entwickelte Zonen-Immunelektrophorese-Assay (5).

Die Raketenimmunelektrophorese wird in einem Agarosegel, das ein monospezifisches Lp(a)-Antiserum in gleichmäßiger Verteilung enthält, durchgeführt. Das Lp(a)-Antigen wird in Probelöcher, die man entlang einer Gelseite ausstanzt, appliziert. Während der Elektrophorese treffen diese Antigene mit den entsprechenden Antikörpermolekülen, die aufgrund ihrer minimalen Eigenladung im Gel nicht wandern, zusammen und bilden langgestreckte Immunpräzipitate in Form von Raketen. Die Höhe dieser Präzipitate ist proportional zur Konzentration des Antigens, wenn dieses in einem definierten Volumen aufgetragen wird.

Bei dem ZIA werden Glaskapillarröhrchen (innerer Durchmesser 2 mm) – in einer speziellen Elektrophoresekammer vertikal angeordnet – mit Lp(a)-antiserumhaltigen Agarosegelen gefüllt. Während der Elektrophorese wandern die Lp(a)-Antigene in das Gel und bilden, wenn sie auf die gegen sie spezifischen Lp(a)-Antikörper treffen, Immunpräzipitate. Der Abstand zwischen der Geloberfläche und der Front der Immunpräzipitate ist proportional zur aufgetragenen Proteinmenge.

Reagenzien und Material

1. Elektrophoresepuffer, pH-Wert = 8,6, Leitfähigkeit: 1,2 mS
Tris 0,108 mol/l
Tricine 0,041 mol/l
in Aqua bidest.
2. Probenpuffer für ZIA
Bromphenolblau 0,005% (w/v)
Saccharose 10% (w/v)
in Elektrophorese-Puffer
3. LE-Agarose (Marine Colloids)
4. Polyethylenglykol MG = 6000
5. Referenzstandard Lp(a) (Immuno Diagnostika GmbH, Heidelberg)
6. Anti-Human-Lp(a) vom Schaf, Becker-Titer 6,2 mg/ml (Immuno Diagnostika GmbH, Heidelberg)
7. Natriumchlorid 0,9% (w/v) in Aqua bidest.
8. Färbelösungen
 - a) Färbelösung A (für RIE) (16)
Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,5% (w/v) in Entfärbelösung A
 - b) Färbelösung B (für ZIA) modifiziert nach Weeke (15)
Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,2% (w/v) in Entfärbelösung B
bei Serva Blau R-250 wird nur etwa 70% der Farbstoffmenge verwendet

9. Entfärbelösungen
 - a) Entfärbelösung A (für RIE)
450 ml Äthanol abs.
100 ml Eisessig
450 ml Aqua bidest.
 - b) Entfärbelösung B (für ZIA)
25 ml Äthanol oder Methanol
8 ml Eisessig
67 ml Aqua bidest.
10. Glasplatten 1 mm stark, 70 × 70 mm
11. Gel Bond-Film 70 × 70 mm
Polyesterfolie mit beidseitig spezialbehandelter Oberfläche
12. Filterpapier
 - a) Filterpapier 2043B Mgl. (Schleicher & Schüll) als Kontaktbrücke zwischen Gel und Puffer bei der RIE
 - b) Filterpapier 70 × 70 mm, 1,8 mm stark
13. Gewebeband 19 mm breit
14. 5 ml-Spritze (Luer-Loc) mit Kanüle
15. Mikroauftragepipette oder Partigen-Dispenser für die RIE

Methodische Durchführung

Raketenimmunelektrophorese

Herstellen der Gelplatten: 1%ige Agarose in Elektrophoresepuffer (w/v) wird in kochendem Wasserbad gelöst und auf 55°C abgekühlt. 7 ml Agaroselösung werden mit 87,5 µl Lp(a)-Antiserum (Endkonzentration 1,25%) gemischt und auf die 70 × 70 mm großen Glasplatten gegossen. Man läßt die Gele 10 min erstarren. Um eine gute mechanische Stabilität zu erhalten, gibt man die fertigen Gelplatten für ein paar Stunden in eine feuchte Kammer. Die Auftragestellen für das Serum werden mit einer Stanzkanüle (Durchmesser 2,5 mm) in Abständen von 5 mm ausgestanzt und mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um störende Randeffekte zu vermeiden, sollte der Abstand des ersten und letzten Loches 10 mm vom Rand betragen.

Probenauftrag und Elektrophorese: Je 5 µl der Standardverdünnungen und des unverdünnten Serums werden mit einer Mikro-Auftragepipette und mit einem Partigen-Dispenser in die Auftragestellen pipettiert. Um eine unerwünschte Vordiffusion zu vermeiden, sollten die Proben erst aufgetragen werden, wenn die Gelplatten bereits auf der Kühlplatte der Elektrophoresekammer liegen und der Kontakt zum Puffer mit den Filterpapierstreifen hergestellt ist. Aus diesem Grund ist auch ein schnelles Auftragen der Proben erforderlich. Wenn möglich, sollte das Stromversorgungsgerät während des Probenauftrags auf etwa 80–100 Volt eingestellt werden. Nach der Probenapplikation stellt man auf dem Gel eine Feldstärke von 1–2 Volt/cm ein. Diese Feldstärke entspricht je nach Widerstand des puffergetränkten Filterpapiers einer Gesamtleistung des Stromversorgungsgerätes von 100–150 Volt konstanter Spannung. Nach ca. 14 Std. (über Nacht) haben sich die Präzipitate ausgebildet.

Waschen, Trocknen, Färben und Entfärben: Nach beendeter Elektrophorese werden die nicht präzipitierten Proteine ca. 24 Std. mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und anschließend noch einige Stunden in destilliertem Wasser

gespült. Zum Trocknen werden die Gelplatten mit wassergetränktem Filterpapier abgedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht oder mit einem Föhn getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Gele 15 min in der Färbelösung A angefärbt. Danach wird der überschüssige Farbstoff in der Entfärbelösung A ausgewaschen. Mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung ist erforderlich.

Auswertung: Die quantitative Auswertung der Präzipitathöhen (Abb. 1) erfolgt über eine Standardkurve.

Zonen-Immunelektrophorese-Assay

Der ZIA wurde in einer speziellen Elektrophoresekammer, der Quantiphor (DESAGA GmbH, Heidelberg), durchgeführt. Ein Röhrchensatz mit 20 vertikal eng nebeneinander und parallel angeordneten Glaskapillarröhrchen (innerer Durchmesser 2 mm), die an beiden Enden durch eine Silikonabdichtung miteinander verbunden sind und in einer Fülleiste stecken, werden in eine innere obere und eine äußere untere Pufferkammer eingesetzt.

1% (w/v) Agarose in Elektrophoresepuffer wird mit Polyethylenglykol 2% (w/v) durch Kochen gelöst und auf 56 °C abgekühlt. Durch Polymere wie Polyethylenglykol wird die Immunpräzipitatbildung verbessert (13). Zu 5 ml dieser Agaroselösung werden 50 µl Anti-Lp(a) pipettiert und gut gemischt. Bei niedriger Antigenkonzentration kann die Antikörpermenge verringert werden.

Die Antiserum-haltige Agarose wird mit einer 5 ml Luer-Loc-Spritze aufgezogen und mit Hilfe einer speziellen Vorrichtung von unten gleichzeitig in alle 20 Kapillaren bis zu einer mit einer Füllmarke markierten Höhe (ca. 3 cm unterhalb der oberen Öffnung) gefüllt. Um eine gute Haftung des Gels an der Röhrchenwand zu erreichen, ist es wichtig, daß die Röhrchen sehr sauber sind. Als Spülmittel wird eine 0,1%ige Tween 80-Lösung empfohlen. Scharfe Mittel wie Säuren oder Alkohol sind für die Reinigung nicht geeignet. Der Röhrchensatz wird anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gespült.

Nach 30 min ist die Agarose in den Kapillaren erstarrt. Der Röhrchensatz wird, nachdem man das Klebeband von der Fülleiste entfernt hat, in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Durch Einspritzen von Puffer werden die Luftblasen vorsichtig aus den Röhrchen entfernt.

Seren und Standard werden mit Probenpuffer verdünnt und mit einer Mikro-Auftragepipette unter die Pufferlösung auf die Gele gebracht. Um zu erreichen, daß die Pufferlösungen direkt über der Geleoberfläche verbleiben, wird ihre Dichte durch Hinzufügen von Saccharose erhöht. Das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau erleichtert das Pipettieren.

Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 40 Volt durchgeführt. Aufgrund seiner negativen Ladung wandert das Lp(a)-Antigen während der Elektrophorese durch das antiserumhaltige Gel in Richtung Anode, wobei es zu einer spezifischen Immunpräzipitation zwischen dem entsprechenden Antigen und Antikörper kommt. Die Bedingungen werden so gewählt, daß die Antikörpermoleküle aufgrund ihrer minimalen Eigenladung im Gel nicht wandern. Nach ca. 16 Std. (über Nacht) haben sich die Präzipitate ausgebildet. Je höher die Proteinkonzentration in der Probe ist, desto länger wird die Zone der Immunpräzipitate.

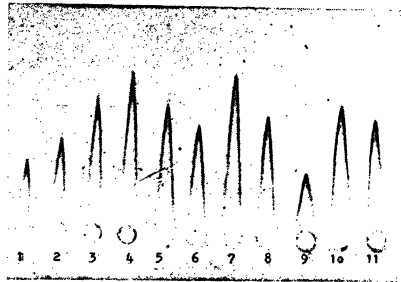


Abb. 1: Quantitative Bestimmung von Lp(a) im Humanserum mit der Raketennimmenelektrophorese (RIE) Auftragestellen 1–4: Standardverdünnungen Auftragestellen 5–11: Serumproben unverdünnt Anti-Human-Lp(a): 87,5 µl/7 ml Agarose Elektrophorese: 1,5 Volt/cm, 14 Std. (über Nacht)

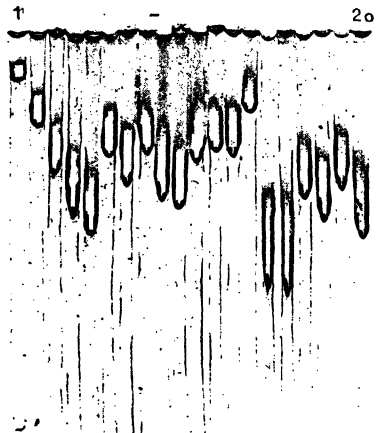


Abb. 2: Quantitative Bestimmung von Lp(a) mit dem Zonen-Immunelektrophorese-Assay (ZIA) Auftragestellen 1–4: Standardverdünnungen Auftragestellen 5–20: Serumproben Verdünnung 1:10, Probenvolumen 24 µl Anti-Human-Lp(a): 40 µl/5 ml Agarose Elektrophorese: 40 Volt, 4 mA, 16 Std.

Nach Ablauf der Elektrophorese werden die Gelstäbchen mit einer speziellen Ausziehvorrichtung aus dem Röhrchensatz herausgenommen und parallel zueinander auf der GelBond-Folie – hydrophile Seite nach oben – angeordnet. Mit einem Spatel oder Glasstab werden die Gele zusammengeschoben. Enthalten die Proben genügend Lp(a), so kann man die Immunpräzipitate bereits im schräg einfallenden Licht erkennen.

Zur quantitativen Auswertung werden die Präzipitate durch Anfärben visualisiert. Zu diesem Zweck werden sie zunächst getrocknet. Um die Zeit des Trocknens zu verkürzen, werden die auf der Folie liegenden Gele auf eine Glasplatte gelegt und mit trockenem Filterpapier bedeckt. Mit einem genau definierten Preßgewicht wird der größte Teil des Wassers herausgepreßt. Nach wenigen Minuten sind die Gele weitgehend von Flüssigkeit und gelösten Proteinen befreit und können mit einem Föhn vollständig getrocknet werden.

Anschließend werden die Gele ca. 2 Std. in physiologischer Kochsalzlösung und ca. 1 Std. in destilliertem Wasser gewaschen. Legt man keinen Wert auf einen vollständig entfärbten Hintergrund, kann der Waschvorgang auch wesentlich verkürzt werden.

Nach dem Trocknen werden die Gele in der Färbelösung B 15 min angefärbt. Danach wird der überschüssige Farbstoff in der Entfärbelösung B ausgewaschen. Mehrmaliges Wechseln

der Entfärbelösung ist erforderlich. Die quantitative Auswertung der Gele (Abb. 2) erfolgt über eine Eichkurve. Sind die Präzipitate kürzer als 2 mm, sollten die Proben weniger verdünnt oder größere Probenvolumina aufgetragen werden.

Da sowohl bei der RIE als auch bei dem ZIA eine Anzahl Faktoren wie Antigen- und Antikörperkonzentrationen, Feldstärke (Volt/cm) und elektrophoretische Mobilität, pH-Wert und Ionenstärke des Puffers die Präzipitathöhe bzw. -länge beeinflussen (14) ist es erforderlich, bei jedem Elektrophoreselauf Standardverdünnungen mitzuführen.

Diskussion

Bei der quantitativen Bestimmung von Lp(a) mit der RIE verläuft die Eichkurve im Konzentrationsbereich zwischen 5–40 mg/dl linear (Abb. 3). Die Seren wurden im Verhältnis 1:2 verdünnt, wenn Präzipitathöhen > 30 mm gemessen wurden.

„Peaks“ < 5 mm konnten nicht mehr quantitativ ausgewertet werden, da nach Laurell (12) so kleine Präzipitathöhen sich nicht mehr proportional zur Proteinkonzentration verhalten.

Mit dem ZIA dagegen können Lp(a)-Konzentrationen im Bereich von 1–5 mg/dl noch gut und reproduzierbar nachgewiesen werden (Abb. 4).

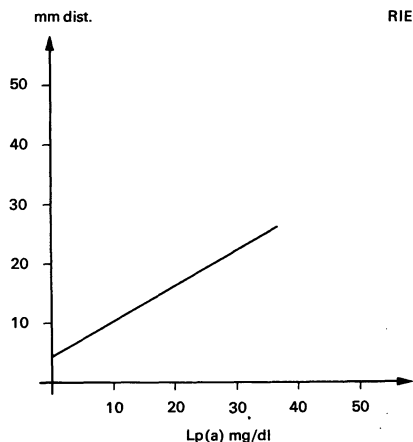


Abb. 3: Standardkurve für die quantitative Bestimmung von Lp(a) mit der Raketimmunelektrophorese (RIE). Korrelationskoeffizient $r = 0,9998$

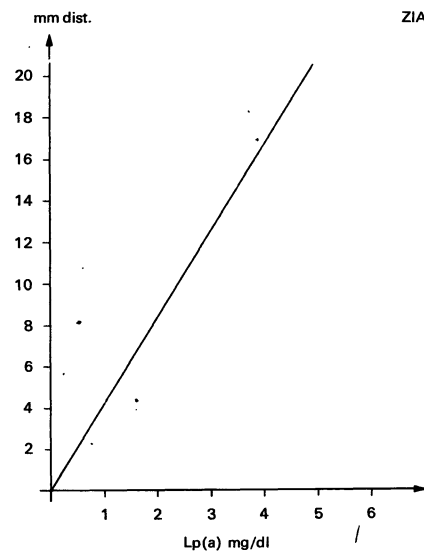


Abb. 4: Standardkurve für die quantitative Bestimmung von Lp(a) mit dem Zonen-Immunelektrophorese-Assay (ZIA). Korrelationskoeffizient $r = 0,9997$

Der Vergleich beider immunoelektrophoretischer Methoden zeigt im Bereich von 6–80 mg/dl Lp(a) eine gute Korrelation (Abb. 5).

Bei der RIE kann es je nach Größe der Auftragestellen zu ungleichmäßigen Feldstärkeverteilungen in den Querschnitten senkrecht zur Stromrichtung an der Probenauftragestelle und von dort in Richtung zur Anode kommen. Weiterhin findet bei der RIE kontinuierlich eine seitliche Diffusion der Proteine statt, so daß besonders bei kurzen Präzipitathöhen eine quantitative Bestimmung oft nicht sehr genau und reproduzierbar ist. Diese seitliche Diffusion ist zwar bei großen Molekülen mit einem Molekulargewicht über 100000 Dalton wie dem Lp(a)-Antigen minimal. Es werden bei optimalem Antigen-Antikörper-Verhältnis langgestreckte Immunpräzipitate gebildet, wobei es oftmals schwierig ist, die Spitze eines „rockets“ genau zu definieren.

Bei der ZIA dagegen findet keine seitliche Ausbreitung von Proteinen statt. Die Feldstärkeverteilung ist durch den gesamten Querschnitt der Gelfröhrchen homogen. Die Antigenmenge korreliert direkt zur Länge der Präzipitate. Das bedeutet eine lineare Eichkurve über einen größeren Konzentrationsbereich als bei der RIE.

Bei dem ZIA können größere Probenvolumina – bis 100 µl Probe – als bei der RIE pipettiert werden. Dadurch werden Ungenauigkeiten beim Pipettieren kleiner Volumina – besonders von Lösungen unterschiedlicher Viskosität – vermieden. Ein weiterer Vorteil des ZIA ist der geringere Verbrauch an Agarose, Puffer und Antikörper je Probe.

Trotz einiger Vorteile des ZIA gegenüber der RIE liegt die Nachweisgrenze bei der quantitativen Bestimmung von Lp(a) nicht wesentlich niedriger. Lp(a)-Konzentrationen unter 0,01 mg/dl können auch mit dem ZIA nicht mehr genau bestimmt werden. Wahrscheinlich ist hier die Molekülgröße von Bedeutung. Bei sehr großen molekularen Antigenen, wie z. B. dem Lp(a), mit einer geringen Eigenladung und relativ vielen autopezifischen Epitopen pro Antigenmolekül führt die Präzipitation mit den spezifischen Antikörpern vom bivalenten IgG-Typ zu einer sehr komplexen, sterisch ungünstigen Vernetzung. Dies und auch der Vernetzungsgrad des Gels als Trennmedium sind Faktoren, die die Sensitivität der Methode beeinflussen. Proteine mit kleinerer Molmasse, wie z. B. das Albumin sind demgegenüber im Bereich von 0,02–0,05 µg/ml mit dem ZIA noch gut nachweisbar. Daher liegt ihre Nachweisgrenze im Vergleich zur RIE auch wesentlich niedriger.

Im Vergleich mit anderen immunchemischen Techniken wie z. B. der radialen Immundiffusion RID bringen sowohl RIE als auch ZIA schnellere Ergebnisse, die Empfindlichkeit ist höher und der Antiserumverbrauch geringer.

Vorteile gegenüber dem Radioimmunoassay (RIA) sind: keine teuren Kits und keine Vorsichtsmaßnahmen betreffs Radioaktivität.

Abschließend kann gesagt werden, daß beide immunoelektrophoretischen Methoden für die quantitative Bestimmung von Lp(a) auch im Routinelabor geeignet sind. Welcher Methode der Vorzug gegeben wird, hängt auch davon ab, welche Meßgenauigkeit erwartet wird, da eine genaue quantitative Lp(a)-Bestimmung im Bereich unter 5 mg/dl nicht immer erforderlich ist.

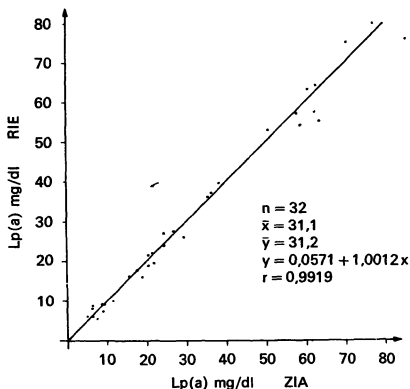


Abb. 5: Vergleich der quantitativen Bestimmung von Lp(a) mit der Raketennimmenelektrophorese (RIE) und dem Zonen-Immunelektrophorese-Assay (ZIA)

Schrittum:

1. ALBERS, J. J., HAZZARD, W. R.: Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Biochem. Genet.* 11, 475–486 (1974).
2. ALBERS, J., ADOLPHSON, J. L., HAZZARD, W. R.: Radioimmunoassay of human plasma Lp(a) lipoprotein. *J. Lipid. Res.* 18, 331–338 (1977).
3. BERG, K., DAHLEN, G., FRICK, M. H.: Lp(a) lipoprotein and pre- β -lipoproteins in patients with coronary heart disease. *Clin. Genet.* 6, 230–235 (1974).
4. BERGER, I.: Quantitative Bestimmung von Lipoprotein Lp(a) im Humanserum mit der Raketennimmenelektrophorese. *mta-journal* 4, 420–422 (1982).
5. BERGER, I., OHLENSCHLAGER, G.: Quantitative Bestimmung von Lp(a) im Humanserum mit einer neuen hochempfindlichen Methode – dem Zonen-Immunelektrophorese-Assay (ZIA). *GIT Labor-Medizin* 5, 333–336 (1982).
6. DAHLEN, G., BERG, K., RAMBERG, U., TAMM, A.: Lp(a) lipoprotein and pre- β -lipoprotein in young adults. *Acta Med. Scand.* 196, 327–331 (1974).
7. DAHLEN, G., ERICSON, C., FURBERG, C., LUNDQUIST, K., SVAROSUDD, K.: Studies on an extra pre- β lipoprotein fraction. *Acta Med. Scand.*, Suppl. 531, 1–29 (1972).
8. JÜRGENS, G., KOSTNER, G. M.: Studies on the structure of the Lp(a) lipoprotein. Isolation and partial characterization of the Lp(a) specific antigen. *Immunogenetics* 1, 560–574 (1973).
9. KOSTNER, G. M.: Lp(a) lipoproteins and the genetic polymorphism of lipoprotein B. In: *Low Density Lipoproteins*. C. E. Day and R. S. Levy, editors. Plenum Publishing Corp., New York, 229–269 (1976).
10. KOSTNER, G. M., AVOGARO, P., CAZZOLATO, G., MARTH, E., BITTOLLO-BON, G., QUINCI, G. B.: Lipoprotein Lp(a) and the Risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 38, 51–61 (1981).
11. LAURELL, C.-B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15, 45 (1966).
12. LAURELL, C.-B.: Electroimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Suppl. 29, 21–37 (1972).
13. LUNDQUIST, U., CESKA, M.: *Immunology* 23, 413–422 (1972).
14. OHLENSCHLAGER, G., BERGER, I., DEPNER, W.: Synopsis der Elektrophorese-Techniken. G-T-Verlag Ernst Gieseler, Darmstadt 1980, 53.
15. WESTERBERG, O.: Quantification of proteins with a new sensitive method – Zone immuno-electrophoresis assay. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 617–624 (1980).
16. WEEKE, B.: *Scand. J. Immunol.*, Suppl. 2, 15–36 (1973).

Anschritt für die Verfasser:

Dr. med. G. Ohlenschläger
Facharzt für Innere Krankheiten
Gustav-Emden-Zentrum der Biologischen Chemie
Labor für angewandte Biochemie
Universitätsklinikum Frankfurt/M
Theodor-Stern-Kai 7
D-6000 Frankfurt/M.