

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

Über die Präparation nephrotoxischer Antikörper in der Gamma-Globulinfraktion mittels der Cellulose-Ionen- Austausch-Chromatographie*

Von

D. BRAUN

unter technischer Mitarbeit von **H. WEGNER**

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Februar 1965)

Die sog. Masugi-Nephritis dient auch heute noch als ein für vergleichende Untersuchungen durchaus geeignetes tierexperimentelles Modell der menschlichen Glomerulonephritis. MASUGI verwandte zur Erzeugung dieser nach ihm benannten Nierenveränderung — wie auch zahlreiche spätere Nachahmer seiner Untersuchungsmethode — ein sog. nephrotoxisches Vollserum, das neben Immunoglobulinen mit spezifischen Antikörpern gegen Nierengewebe (Glomerulumschlingen, ROTHER und SARRE) noch alle übrigen Serumeiweiße enthielt. Diesen, also die Immunoglobuline begleitenden Eiweißen, konnte aber ein möglicher pathogenetischer Effekt für die Entstehung der sog. Masugi-Nephritis nicht abgesprochen werden, so daß in jüngster Zeit ORTEGA und MELLORS das „nephrotoxische“ Gamma-Globulin unter Verwendung der Cohnschen Alkoholfraktionierung — in der Methodik nach DEUTSCH — separierten, bevor sie nach dem Modell von MASUGI eine Nierenentzündung erzeugten; tatsächlich erzielten sie mit einem so gereinigten Gamma-Globulin vom Kaninchen — mit nephrotoxischem Antikörpercharakter gegen Ratten-Nierengewebe — eine Glomerulonephritis bei Ratten. Auch HAFERKAMP trennte bei seinen immunopathologischen Untersuchungen an Schilddrüse und Speicheldrüsen der Ratten in der präparativen Flüssigkeitsselektrophorese die Immunoglobuline (= Gamma-Globuline) von Kaninchen mit Antikörpern gegen Ratten-Speicheldrüsen- bzw. Ratten-Schilddrüsengewebe ab.

Da nun auf der einen Seite die präparative Darstellung von antikörpercharaktertragenden Immunoglobulinen in der Flüssigkeitsselektrophorese sehr zeitraubend ist, auf der anderen Seite aber die Ausfällung der erwähnten Globuline mittels Alkoholfraktionierung nicht absolut sicher vom Einwand einer Eiweißdenaturierung befreit werden kann, bot sich für weitere vergleichende Untersuchungen als Isolierungsverfahren für Gamma-Globuline die Cellulose-Ionen-Austausch-Chromatographie an. Diese Methode soll nach NITSCHMANN nicht nur nach kürzester Zeit hochgereinigte Gamma-Globuline, sondern diese Eiweiße auch in undenaturiertem Zustande liefern. Es wurden daher beim Kaninchen gewonnene heterologe Antikörper gegen Ratten-Nierenextrakt in der Gamma-Globulinfraktion mittels der Ionen-Austausch-Cellulose unter immunoelektrophoretischer und serologischer Kontrolle separiert, diese Immunoglobuline

* Arbeit auf Veranlassung und unter Leitung von Doz. Dr. O. HAFERKAMP.

dann gesunden Ratten i. v. injiziert und immunhistologisch überprüft, ob die injizierten Gamma-Globuline — mit den Rattennieren-Antikörpern — auch tatsächlich ihr Erfolgsorgan, die Nieren, erreicht und sich auf den Glomerula niedergeschlagen hatten.

Methodik

Als Antikörperspender dienten 5 Monate alte Hauskaninchen beiderlei Geschlechts, zur Nierenextrakt-, d. h. zur Antigengewinnung und auch als „Antikörper“-Empfänger wurden $\frac{1}{2}$ Jahr alte Albinoratten beiderlei Geschlechts (Sprague-Dawley-Stamm) verwandt.

I. Nierenextraktgewinnung

60 Ratten beiderlei Geschlechts wurden mit gepufferter physiologischer Kochsalzlösung bis zur weitgehenden Blutfreiheit der Nieren durchspült. Dann wurden die herauspräparierten Nieren zerkleinert. Vier Volumenteile Aceton wurden mit einem Volumenteil Nierenbrei versetzt. Nach Sedimentation der Gewebsbestandteile wurde der Überstand abgesehen und sodann der Nierenbrei und gepufferte physiologische Kochsalzlösung in gleichen Volumenanteilen zusammengebracht, der Nierenbrei dreimal bei 6000 U/min mit dieser physiologischen Kochsalzlösung gewaschen und anschließend auf einem Büchner-Filter mit Aceton bis zur Trockenheit des Nierenhomogenates gewaschen. Das so gewonnene Nierenpulver wurde in sterile Ampullen eingeschmolzen. 1 g dieses Pulvers wurde mit 10 ml gepufferter physiologischer Kochsalzlösung versetzt und 4 Wochen lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Eisschrank belassen, sodann zentrifugiert und eine Eiweißbestimmung nach KJELDAHL ausgeführt; sie ergab einen Wert von 0,756 g-%. Dieser Überstand diente als Ausgangs-Antigen- (Standard-extrakt-)Lösung (= Ag) für alle weiteren Untersuchungen.

II. Antigeninjektion bei Kaninchen zur Antikörperbildung (Sensibilisierung)

Zwei Kaninchen wurden insgesamt 17 mg Antigenprotein (Ag-P) injiziert, und zwar nach folgendem Schema: In der ersten Woche 0,1 ml (= 1 mg Ag-P) + 0,01 Freundesches Adjuvans (FA) i. m., in der 2. Woche 0,2 ml (= 2 mg Ag-P) und 0,02 FA i. m., in der 3. Woche viermal 0,05 ml (= 2 mg Ag-P) i. v., in der 4. Woche viermal 0,1 ml (= 4 mg Ag-P) i. v. und in der 5. Woche viermal 0,2 ml (= 8 mg Ag-P i. v.) in die Ohrvene. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen aus der Bauchorta entblutet, das Blut über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ abgesetzt und in sterilen Ampullen eingeschmolzen.

III. Nachweis der heterologen Antikörper

Agarpräzipitationstest nach Ouchterlony in der Mikromethode auf Objektträgern (s. HITZIG, HAFFERKAMP³). In das zentrale Loch wurde die Ag-Lösung und in die peripheren Löcher das Antiserum vom Kaninchen gebracht, und zwar in das Loch bei 12 Uhr das unverdünnte Serum und im Uhrzeigersinn anschließend die Serumverdünnungen (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000).

Ergebnis. Es gelang, in den Seren der mit Ag behandelten Tiere drei Präzipitatbanden nachzuweisen (vgl. Abb. 1). Auffallend scharf konturiert war das dem mit Ag-Extrakt gefüllten Loch benachbarte Präzipitat, welches nach den Untersuchungen von ROSS und VORLAENDER durch das Zusammentreffen des nierenspezifischen Ag mit seinem homologen Antikörper entsteht, also nierenspezifisch ist. Dieses Präzipitat ließ sich bei dem einen sensibilisierten Tier bis zu einer Serumverdünnung von 1:10 und bei dem zweiten entsprechend behandelten Kaninchen in allen Serumverdünnungen, also bis 1:10000 nachweisen.

Immunelektrophoretische Analyse in der Mikromethode nach SCHEIDEGGER (Methodik s. bei HITZIG oder HAFFERKAMP³). In die Stanzlöcher wurde eine Verdünnung des 0,756 %igen Ag-Extraktes von 1:100 bzw. 1:200 eingefüllt und dann 70 min lang bei 15 mA Stromstärke und 25 V Spannung elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde jeweils eines der beiden

Antinieren-Seren von den Kaninchen und ein Antirattenserum von der Ziege (Behringwerke) in die Rillen eingefüllt; entsprechend wurden die Antinieren-Seren gegen normales Rattenserum untersucht.

Ergebnis. Bei Verwendung der gegen Rattennierenextrakt gerichteten Antisera stellten sich vom Nieren-Ag drei Präcipitate dar, und zwar eines, das dem Präcipitat nach dem Albumin sowie ein zweites, welches so dem Gamma-Globulin

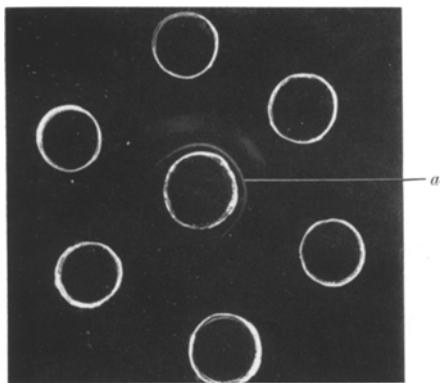


Abb. 1. Agar-Präcipitationstest (OUCHTERLONY) eines Kaninchensera nach Sensibilisierung des Tieres gegen einen Acetonextrakt aus Rattennierengewebe. Im zentralen Loch der Acetonextrakt aus Rattennierengewebe, in den peripheren Löchern bei 12 Uhr beginnend unverdünntes, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 verdünntes Antiserum des Versuchskaninchens. Dicht um das mit Ag gefüllte zentrale Loch ein scharf gezeichnetes Präcipitat (a), entsprechend einer Reaktion zwischen dem „nieren-spezifischen“ Ag und dem „nephrotoxischen“ Antikörper

entsprach; ein drittes Präcipitat kathodenwärts in gerader Fortsetzung des Stanzloches war dagegen im normalen Rattenserum nicht auffindbar. Brachte man auf der Immunelektrophoreseplatte das aufgetrennte Nieren-Antigen mit einem Antirattenserum von der Ziege in Reaktion, so erhielt man lediglich die Darstellung eines Albumin-, eines Alpha₂- und Gamma-Globulinpräcipitates bei einer Ag-Verdünnung von 1:10. Mit dem Antirattennieren-Serum vom Kaninchen konnten wir offenbar infolge ungünstiger Antigen-Antikörper-Korrelation keine Präcipitatreaktion mit irgendeinem der Serumproteine nachweisen. Es sieht also so aus, als ob tatsächlich das bei der Ag-Auftrennung und der anschließenden Einwirkung der Anti-Rattennieren-Seren auftretende Präcipitat in der Nachbarschaft des Stanzloches mit seinem kathodenwärts gerichteten Verlauf „nieren-

spezifisch“ wäre; es dürfte mit dem „antigenlochnahen“ nierenspezifischen Präcipitat bei dem Agar-Präcipitationstest identisch sein.

IV. Präparative Gewinnung des antikörperhaltigen Gamma-Globulins aus den Kaninchenseren unter immunoelktrophoretischer Kontrolle: Fraktionierungsvorgang

10 ml Kaninchenserum wurden auf einer 2,5 cm breiten und 10–12 cm hohen Diäthyl-Amino-Äthyl-(DEAE-) Cellulosesäule mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 20 ml pro Stunde (bei +4° C) fraktioniert. Als Elutionslösungen dienten folgende Pufferlösungen („Gradienten“): NaPO₄-Puffer 0,005 m, pH 7,0 = Gradient 1; NaPO₄-Puffer 0,02 m pH 6,0 = Gradient 2; NaH₂PO₄ 0,05 m, pH 4,6 = Gradient 3; NaH₂PO₄ 0,1 m, pH 4,6 = Gradient 4 und NaH₂PO₄ 0,3 m, pH 4,6 = Gradient 5. Nachdem ein Serum eingesickert war, wurden entsprechend einer diskontinuierlichen Gradientenelution (HESS und WALTER) zuerst 100 ml des Gradienten 1 und fortlaufend dann die übrigen Gradienten (2–5) hinzugefügt und zwar jeweils 100–200 ml der einzelnen Gradienten-Pufferlösungen, das Eluat wurde in Fraktionen von 20 ml gesammelt, die Eiweißkonzentration der Eluatportionen im Photometer „Eppendorf“ bestimmt und schließlich die einzelnen Portionen gegen Aqua dest. bei +4° C 24 Std lang dialysiert. Nach Lyophilisierung wurden die so gewonnenen Proteine in sterile Ampullen eingeschmolzen.

Die immunoelktrophoretische Auftrennung der 1%igen Eluatfraktionen gegen Antikaninchenserum nach der Mikromethode auf Objektträgern in der Modifikation von SCHEIDEGGER (s. bei HITZIG oder HAERKAMP²). *Ergebnis.* Nur in den

Fraktionen 1 bis 13 entsprechend den Gradienten 1 und 2 konnte von den beiden Seren der mit Ag behandelten Kaninchen immunoelektrophoretisch reines Gamma-

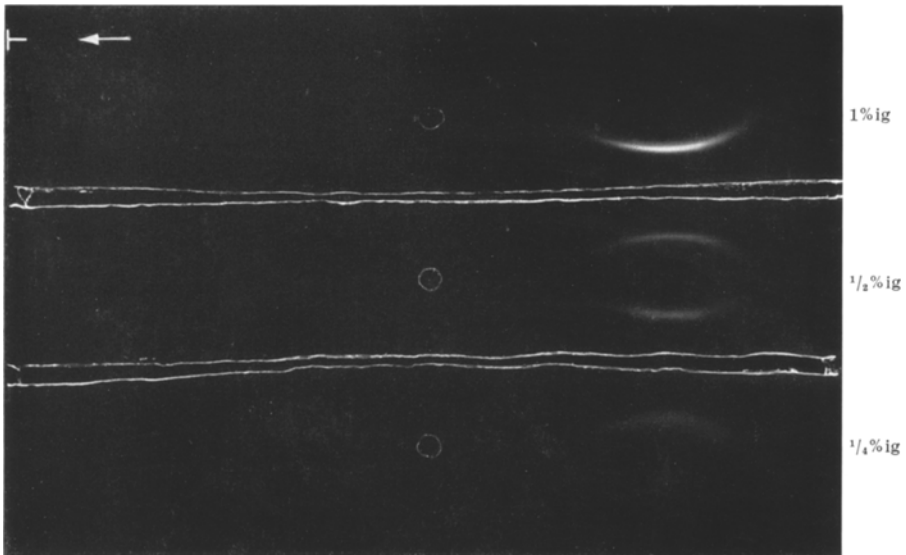


Abb. 2a. Immunoelektrophoretische Analyse des in der Cellulose-Ionen-Austausch-Chromatographie mit dem Salzgradienten 1 eluierten Gamma-Globulins des Kaninchenserums unter Verwendung eines Anti-Kaninchenserums vom Schaf

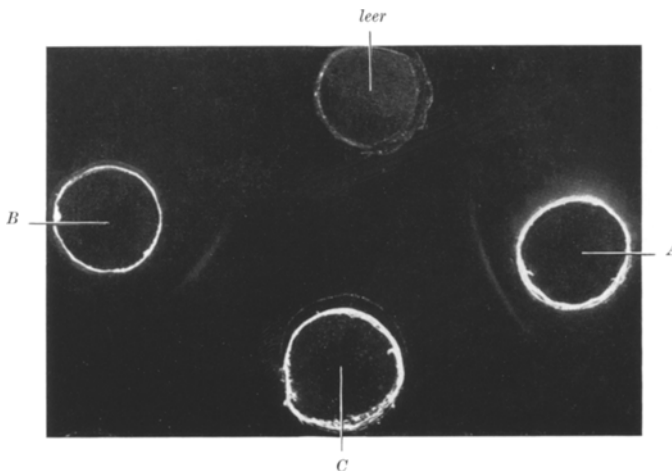


Abb. 2b. Agar-Präzipitationstest (OUCHTERLONY) für das in der Abb. 2a in der immunoelektrophoretischen Analyse dargestellte Gamma-Globulin von dem Kaninchenserum der Abb. 1. Im Loch A befindet sich das 1:100, im Loch B das 1:200 verdünnte Ag, im Loch C das chromatographisch eluierte, auf eine 1%ige Lösung konzentrierte Gamma-Globulin. Deutlich erkennbare, dem Ag-Loch benachbarte Präzipitationslinie bei Loch A, schwächere bei B, als Ausdruck eines im eluierten γ -Globulin bewahrten „nephrotoxischen“ Antikörpergehaltes

Globulin gewonnen werden, das im Verlaufe seines Präzipitates dem menschlichen Gamma₂-Globulin entsprach (vgl. Abb. 2a). Erst bei den Gradienten 3 und 4 lösten sich dann die anderen Serumfraktionen (Alpha- und Beta-Globuline sowie Albumin) von der Säule. Schließlich eluierte der Gradient 5 neben Albumin,

einem Alpha₂- und einem Beta-Globulin auch solche Globuline, die dem menschlichen Gamma_{1M}- und Gamma_{1A}-Globulin im immunoelektrophoretischen Verhalten entsprechen.

Serologischer Antikörpernachweis im chromatographisch abgetrennten Gamma-Globulin. Das in der immunoelektrophoretischen Analyse darstellbare Gamma-Globulin der chromatographischen Eluate wurde im Agar-Präcipitationstest nach OUCHTERLONY auf seine Antikörper-Aktivität gegenüber dem Rattennierenextrakt geprüft (vgl. Abb. 2b). Auffallend konstant ließ sich dabei das offenbar

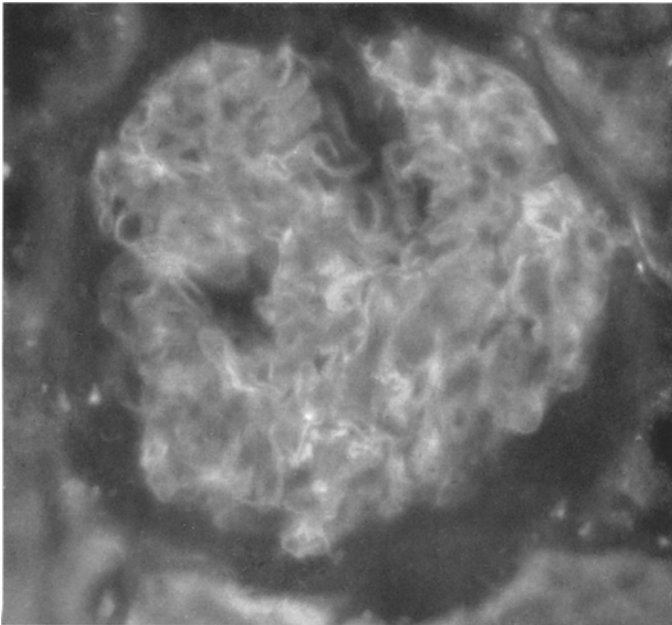


Abb. 3. Immunohistologischer Nachweis des nach der chromatographischen Reinigung gesunden Ratten injizierten Gamma-Globulins (der Abb. 2a und b) mit serologisch nachgewiesenem spezifischen Antikörper gegen Rattennierengewebe mittels eines an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelten Anti-Kaninchenglobulins vom Schaf. Im Präparat gelb-grüne, in der Wiedergabe weißliche markierende Fluoreszenz auf den Glomerulumschlingen. Vergr. 450 ×

„nierenspezifische Ag-Antikörper-Präcipitat“ nachweisen, welches sich wie bei der Prüfung des Vollserums stets nahe um das mit Ag angefüllte Loch fand. Die beste Präcipitation erreichten wir bei einer Ag-Verdünnung von 1:100 und unverdünntem, d. h. 1%igem Gamma-Globulin. Somit scheint also das chromatographisch eluierte Gamma-Globulin der sensibilisierten Kaninchen seine spezifische Antikörper-Aktivität gegen das Nieren-Ag behalten zu haben.

V. Immunohistologische und histologische Nierenuntersuchungen nach Injektion der in der Chromatographie eluierten Gamma-Globuline mit den heterologen Antikörpern gegen Rattennierenextrakt bei gesunden Ratten

Das aus beiden nephrotoxischen Kaninchenserum eluierte Gamma-Globulin mit Antikörpern gegen Rattennierengewebe wurde zusammengebracht. 14 Ratten wurden 0,9 ml dieser 1%igen Gamma-Globulinlösung i.v. injiziert, weitere 5 Ratten erhielten zum Vergleich 0,9 ml nephrotoxisches Vollserum. Alle 19 Tiere wurde am 35. Tag nach dieser Injektion zusammen mit 10 unbehandelten, gleichaltrigen Kontrolltieren getötet.

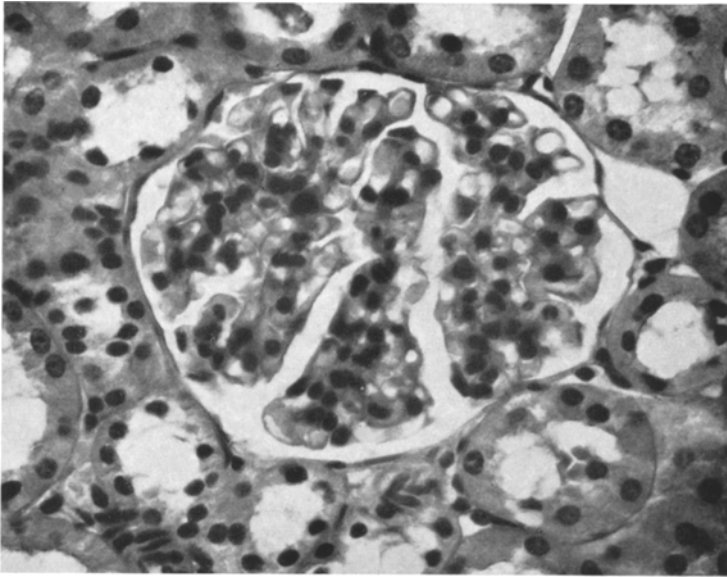


Abb. 4a. Nicht verändertes Glomerulum aus einer Rattenniere der Kontrollgruppe, die kein Serum oder Gamma-Globulin mit Antikörper gegen Rattennierengewebe erhalten hatte. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Vergr. 312 ×

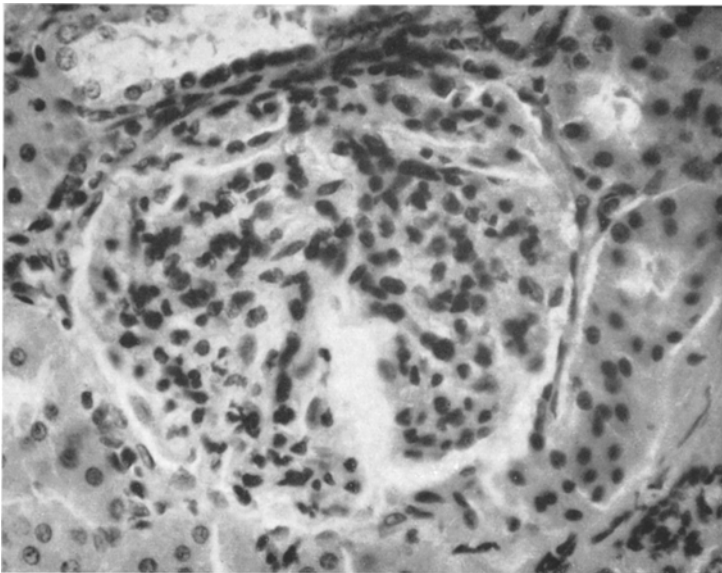


Abb. 4b. Rattenniere am 35. Tag nach Injektion des in der Cellulose-Chromatographie gereinigten Gamma-Globulins (vgl. Abb. 2a und b) mit spezifischem Antikörper gegen Rattennieren. Schlingenverklebungen sowie leukocytaire und lymphocytaire Infiltrate im Glomerulum, entsprechend einer nichteitrigen Glomerulitis. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Vergr. 312 ×

Der immunohistologische Nachweis der injizierten Globulinfraktion — mit den heterologen Antikörpern gegen Rattennieren — in den Nieren dieser 19 Ratten erfolgte nach der indirekten Methode von COONS und KAPLAN entsprechend einem von MELLORS u. Mitarb. ausgearbeiteten Schema mit einem an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten (= markierten), gegen

Kaninchenglobulin gerichteten Antiserum vom Schaf — eigener Herstellung — (genaue Methodik s. HAFERKAMP³).

Kontrollen. Überschichtung des Schnittes mit einem nicht markierten Antikaninchenglobulin vom Schaf, Abspülen mit Kochsalzlösung, Überschichtung mit dem markierten Anti-Kaninchenglobulin vom Schaf.

Ergebnis. Im UV-Licht zeigte sich — unter Berücksichtigung der Eigenfluoreszenz des Nierengewebes — eine gelb-grüne Fluoreszenz des markierenden Antikaninchenglobulins fast ausschließlich auf den Glomerulumschlingen der mit dem Gamma-Globulin und auch dem Vollserum injizierten Kaninchen (vgl. Abb. 3); da die gelb-grüne Fluoreszenz bei der Kontrolle der Methode wesentlich schwächer ausfiel, sieht es demnach so aus, als hätten tatsächlich die Gamma-Globuline mit spezifischem Antikörpergehalt gegen Nierengewebe ihr Ziel, d. h. die Glomerula der Nieren, erreicht.

Die in Formalin fixierten Nierenhälften zeigten — mit Ausnahme der Nieren von den unbehandelten Kontrolltieren (vgl. Abb. 4a und b) — histologisch bei allen 19 Versuchstieren die gleichen Veränderungen, die von Versuchstier zu Versuchstier nur leicht in bezug auf Stärke und Ausdehnung wechselten. Im einzelnen wiesen die Nieren der Versuchstiere das Bild einer nichteitrigen Glomerulitis auf (vgl. Abb. 4b) mit lymphocytärer und leukocytärer Infiltration und Verdichtung der Zellkerne im Bereiche der Glomerula bei Kapseladhäsionen der auch untereinander verklebten Schlingen. Dabei war es vereinzelt zu einer Proliferation von Kapselendothelien im Sinne einer beginnenden Halbmondbildung gekommen.

Diskussion

Die vorliegenden eigenen Versuche zeigen, daß in der Cellulose-Chromatographie isoliertes und immunoelektrophoretisch reines Gamma-Globulin mit spezifischem Antikörpercharakter gegen Rattennierengewebe nach seiner i.v. Injektion durchaus in der Lage ist, in Nieren eine nichteitrige Glomerulitis zu erzeugen. Demnach scheinen Rattennieren auf die Injektion in der Gamma-Globulinfraktion vorkommender, spezifisch gegen sie gerichteter Antikörper ein anderes Verhalten als Rattenspeichel- und Rattenschilddrüsen aufzuweisen. Erkrankten die zuletzt erwähnten Organe nach den Versuchen HAFERKAMPS doch nur dann, wenn nach einer Injektion eines spezifisch gegen Speichel- bzw. Schilddrüse gerichteten heterologen Antikörperglobulins entweder noch das zugehörige Antigen (Extrakt aus Speichel- bzw. Schilddrüse) oder ein Fremdeiweiß nachinjiziert wurde. Das verschiedene Verhalten der erwähnten Organe erklärt sich am ehesten noch durch den unterschiedlichen anatomischen Aufbau. Stellt doch das Ag-Substrat bei den Nieren die Masse der Schlingenwandungen in den Glomerula, also gewissermaßen das Gefäßsystem selbst dar, wohingegen die Gamma-Globuline mit spezifischem Antikörpercharakter bei der Schilddrüse und den Speicheldrüsen erst Gefäßschranken durchbrechen müssen, um an die für sie antigenen Gewebekomponenten, die Follikelepithelien bzw. die Parenchymzellen der Speicheldrüsen, zu gelangen.

Zusammenfassung

Die Cellulose-Ionen-Austausch-Chromatographie ist als ein technisch einfaches Verfahren geeignet, Gamma-Globuline von Kaninchen mit spezifischem Antikörpercharakter gegen Rattennierengewebe zu eluieren. Dabei scheinen diese Globuline ihren spezifischen Antikörpercharakter zu bewahren. Sie sind nämlich

imstande, bei i.v. Injektion in gesunden Ratten ebenso eine Glomerulitis zu erzeugen wie i.v. einverleibtes sog. nephrotoxisches Vollserum.

On the Preparation of Nephrotoxic Antibody in the Gamma-Globulin Fraction by means of Cellulose-Ion-Exchange Chromatography

Summary

Cellulose-ion-exchange chromatography is a technically simple procedure suited to elute rabbit gamma-globulin of a specific antibody character directed against rat renal tissue. With this procedure, the globulins preserve their specific antibody character. On i. v. injection into healthy rats these globulins are as capable of inducing a glomerulitis as i. v. administered so-called nephrotoxic whole serum.

Literatur

- COONS, A. H.: Antibodies and antigens labelled with fluorescein. *Schweiz. Z. allg. Path.* **22**, 693—697 (1959).
- , and M. H. KAPLAN: *J. exp. Med.* **91**, 1 (1950).
- FREUND, J.: Sensitation with organ specific antigens and the mechanism of enhancement of immune responses. *J. Allergy* **28**, 18—19 (1957).
- GRABAR, P., et P. BURTIN: *Analyse immuno-electrophorétique*. Paris: Masson & Cie. 1960.
- HAFERKAMP, O.: Die Immunoparotitis im Tierexperiment. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*, 67. Tagg. 1962, S. 722—726.
- Tierexperimentelle Untersuchungen zur Immunopathologie der Schilddrüse. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 46. Tagg. 1962, S. 149—151.
- Ein tierexperimenteller Beitrag zur Immunopathologie der Speicheldrüsen. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 298—322 (1962).
- HESS, B., u. S. J. WALTER: Chromatographische Serumeiweißfraktionierung und ihre klinische Anwendung. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*, 66. Tagg. 1961, S. 639—647.
- HITZIG, W. H.: Praktische und theoretische Ergebnisse neuerer Bluteiweißuntersuchungen. *Schweiz. med. Wschr.* **90**, 4449 (1960).
- MASUGI, M.: Über das Wesen der spezifischen Veränderungen der Niere und Leber durch das Nephrotoxin und Hepatotoxin. *Beitr. path. Anat.* **91**, 82—112 (1933).
- MELLORS, R. C., J. ARIAS-STELLA, M. SIEGEL, and D. PRESSMAN: Analytical pathology II. Histopathologic demonstration of glomerularlocalizing antibodies in experimental glomerulonephritis. *Amer. J. Path.* **31**, 687—715 (1955).
- METZGER, H., K. C. HSU, M. ROTHENBERG, B. C. SEEGAL, and M. L. CHAPEAU: Studies of the mechanism of experimental nephritis with fluoresceinlabelled antibody. II. Localization and persistence of injected rabbit or duck antirat-kidney serum during the course of nephritis in rats. *Amer. J. Path.* **41**, 183—203 (1962).
- NITSCHMANN, Hs.: Neuere Fraktionierungsmethoden. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*, 66. Tagg. 1961, S. 557—586.
- ORTEGA, L. G., and R. C. MELLORS: Analytical Pathology. IV. The role of localized antibodies in the pathogenesis of nephrotoxic nephritis in the rat. *J. exp. Med.* **104**, 151—170 (1956).
- ROSS, J., u. K. O. VORLAENDER: Über die Darstellung organeigener Gewebsantigene der Niere mittels Präzipitation im Agar-Gel. *Int. Arch. Allergy* **17**, 86—98 (1960).
- ROTHER, K., u. H. J. SARRE: In: *Immunopathologie in Klinik und Forschung* von P. MIESCHER und K. O. VORLAENDER, 2. Aufl., S. 321—369. Stuttgart: Georg Thieme 1961.
- SCHLIDEGGER, J. J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* **7**, 103—110 (1955).
- SOBER, H. A., F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF, and E. A. PETERSON: Chromatography of Proteins. II. Fractionation of serum protein on anion-exchange cellulose. *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 756—763 (1956).

Dr. D. BRAUN
Pathologisches Institut der Universität
53 Bonn 1, Postfach