

**Zusammenfassung.** In Thiamin-Mangelküken wurde eine erhöhte Thiamin-Diphosphatase-Aktivität festgestellt. In Figur 1 sind die Mengen an freigesetztem anorganischem Phosphat in  $\mu\text{Mol/g}$  Gewebe/h angegeben. Die Normalwerte betragen durchschnittlich 43,0 Einheiten, während das pathologische Gewebe bis zu 60 Einheiten enthält. Die Unterschiede sind signifikant,

$P < 0,05$ . Der Effekt kann durch Zusatz von Thiamin zum Futter aufgehoben werden.

D. NAIDOO

Department of Clinical Research, Ontario Hospital, Toronto (Canada), March 5, 1962.

### Gibt es peptisch-tryptische Abbaustufen des Gliadins mit Antigencharakter?

Die im Titel gestellte Frage haben wir in einer früheren Arbeit verneint<sup>1</sup>. Wir hatten festgestellt, dass nach peptisch-tryptischem Abbau des Gliadins, nach Inaktivierung der Enzyme und anschliessender Ultrafiltration des Verdauungsgemisches dieses nicht mehr mit Antiserum gegen Gliadin im Komplementbindungsversuch reagierte. Der enzymatische Abbau des Gliadins allein ohne folgende Ultrafiltration führte zu einer beträchtlichen Abschwächung der Reaktion, aber nicht zu Nullwerten. Ein Restbetrag an Gliadin war bei positiven Reaktionen also stets vorhanden.

Kürzlich haben TAYLOR et al.<sup>2</sup> jedoch angegeben, dass sie mit der Methode der Hämaggglutination positive serologische Reaktionen mit einem Produkt aus Gluten erhielten, das von FRAZER et al.<sup>3</sup> als Fraktion 3 bezeichnet wird. Bekanntlich enthält Gluten etwa 50–60% Gliadin, so dass die Befunde Taylors auch mit einem Antigliadinserum geprüft werden können.

Fraktion 3 wird aus Gluten durch peptisch-tryptische Verdauung gewonnen, worauf die Lösung auf pH 4,5 gebracht wird. Die bei dieser Reaktion entstehende Fällung wird entfernt, der lösliche Anteil zur serologischen Prüfung verwendet. Die Frage, ob die durch ihn bewirkten serologischen Reaktionen durch Reste des Glutens oder durch Abbauprodukte bewirkt waren, wurde durch die genannten Autoren<sup>2</sup> nicht weiter verfolgt. Wir haben diese Frage deshalb erneut bearbeitet, gleichzeitig machten wir Parallelversuche mit Gliadin als Ausgangsmaterial.

**Methodik.** Gluten und Gliadin waren Handelspräparate. Letzteres wurde zur Entfernung von Lipiden vor der Verarbeitung mit Alkohol-Äther behandelt. Die Lösung des Gliadins wurde so bewerkstelligt, dass zu 98 ml von 70% Alkohol 2 ml 0,1*n* NaOH zugefügt wurden. Hierin wurde das Gliadin (z. B. 0,5 g) gelöst (37°, häufiges Umschütteln). Nach völliger Lösung wurde der Alkohol bei verminderter Druck bei 40°C abdestilliert. Der verbleibende Rest wird mit destilliertem Wasser auf das gewünschte Volumen gebracht, womit die Stammlösung für die Versuche gewonnen ist. Sie ist bei 4°C ohne Zusätze einige Tage haltbar. Schwache Trübungen können durch etwas NaOH und Erwärmen wieder beseitigt werden. Die Verdünnungsansätze mit Kochsalzlösung sind instabil, indem unter zunehmender Trübung allmählich eine Fällung des Gliadins durch die Chlorionen erfolgt. Diese Verdünnungen müssen also sofort verarbeitet werden.

Zu den Komplementbindungsversuchen sei bemerkt, dass die Verdauung zu Produkten mit antikomplementären Eigenschaften führen kann. Es ist deshalb eine Titerierung des Komplements für jeden Ansatz erforderlich.

Unsere Resultate geben wir in der Tabelle wieder.

Das Ergebnis der Versuche ist eindeutig. Der lösliche Anteil der Verdauungsgemische nach Ausfällung bei

Geprüfte Lösung	Titer im Komplementbindungsversuch mit Antigliadinserum vom Kaninchen
1. Gliadin 500 mg%	1: > 59000
2. 67 mg%	1:2187
3. Gluten 1% pept.-trypt. verdaut, bei pH 4,5 ausgefällt, löslicher Anteil neutralisiert	1:59000 (bzw. 1:81 infolge Nachlösung)
4. Gliadin 1%, ebenso behandelt	1:27 (bzw. 1:9 infolge Nachlösung)
5. wie 3., dann bei pH 4,4 autoklaviert	1:81
6. wie 4., dann bei pH 4,5 autoklaviert	1:81
7. wie 5., dann ultrafiltriert, Filtrat	0
8. wie 6., dann ultrafiltriert, Filtrat	0
9. Filterrückstand von 7.	1:81
10. Filterrückstand von 8.	1:81

pH 4,5 und Renerualisierung ergibt positive Komplementbindung, enthält also noch Antigen. Dieser Rest übersteht sogar das Autoklavieren bei saurer Reaktion. Da von uns in früheren Versuchen gezeigt worden war<sup>4</sup>, dass Autoklavieren bei alkalischer Reaktion zum Verlust der Antigenbindungsähigkeit führt, haben wir solche Versuche nicht nochmals wiederholt. Autoklavieren bei pH 7,8 lässt einen Gliadines übrig. Die Ultrafiltration zeigt, dass am positiven Ausfall von Versuch 5 und 6 das Ultrafiltrat unbeteiligt ist, das heisst, dass die das Ultrafilter passierenden Abbaustufen nicht mehr fähig sind, Komplement zu binden. Dagegen ist der Rückstand auf dem Filter, wenn er im gleichen Volumen wieder gelöst wird, noch voll aktiv, er stellt also das Antigen dar.

Damit ist die eingangs gestellte Frage, ob peptisch-tryptische Abbaustufen des Gliadins, welche in der so genannten Fraktion 3 vorhanden sind, Antigencharakter haben, in dem Sinne beantwortet, dass dies nicht der Fall ist, sobald diese Substanzen durch Ultrafiltration abgetrennt werden. Geschieht dies nicht, dann treten die Eigenschaften eines Antigens hervor, weil Reste von Gliadin vorhanden sind.

**Summary.** Peptic and tryptic digestion of gluten and gliadin leaves a part of the substrates unaltered after precipitation at pH 4.5. Complement fixation test of the

<sup>1</sup> E. BERGER und E. FREUDENBERG, *Annales Päd.* 196, 238 (1961).

<sup>2</sup> K. B. TAYLOR, D. L. THOMSON, S. L. TRUELOVE und R. WRIGHT, *Brit. Med. J.* 1961, 1727.

<sup>3</sup> A. C. FRAZER, R. F. FLETCHER, C. A. ROSS, B. SHAW, H. G. SIMMONS und R. SCHNEIDER, *Lancet* 1959 II, 252.

<sup>4</sup> E. FREUDENBERG, *Ann. Päd.* 197, 400 (1961).

soluble part remains positive even after autoclaving of this part at pH 4.5, but not so after autoclaving at alkaline reaction. Positive reactions are also given by the components which are not ultrafiltrable while the ultrafiltrates give negative reactions. This means that positive reactions originate from residues of gluten or gliadin respectively. The question posed in the title must be

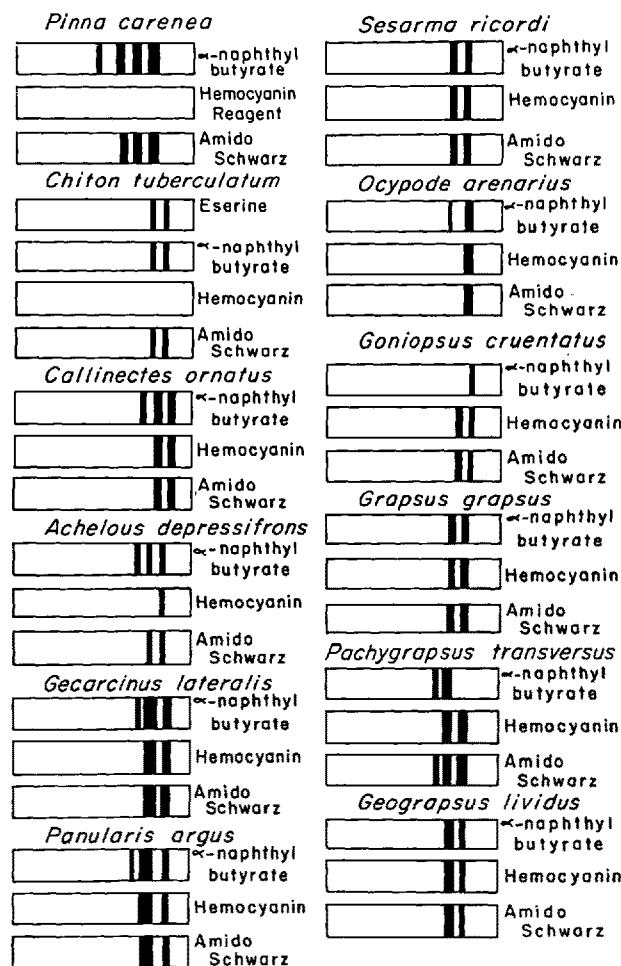
answered in the negative. Products of peptic-tryptic digestion of gliadin do not have antigenic properties.

E. BERGER und E. FREUDENBERG

Serologisches Laboratorium des Basler Universitätskinderhospitals, Basel (Schweiz), 12. März 1962.

### A Starch Gel Electrophoretic Study of the Hemolymph Proteins of some Bermuda Crustacea<sup>1,2</sup>

The starch gel zone electrophoresis method developed by SMITHIES<sup>3</sup> has been widely employed for the characterization of mammalian serum proteins. Woods et al.<sup>4</sup> and ENGLE and Woods<sup>5</sup> also used this method with excellent success to examine the serum proteins of a number of invertebrates. They suggested that some of the more prominent protein bands from crustacean hemolymph might represent dissociation products of the copper-containing respiratory pigment, hemocyanin. WHITTAKER<sup>6</sup>, however, employing a rubanic acid histochemical method for copper, demonstrated that two adjacent protein bands from the hemolymph of two crayfish species and one protein band from *Limulus* gave positive copper reactions. We undertook the present investigation to determine the



extent to which multiple copper-positive protein bands occur in crustacean hemolymph and to examine the multiplicity of hemolymph proteins in general.

The hemolymph proteins of ten species of decapod crustaceans and of two molluscan species were examined by starch gel zone electrophoresis. Starch gel was prepared using Connaught Laboratories (Toronto, Canada) hydrolyzed starch at the recommended concentration in 0.015 M tris buffer at pH 7.5. Samples run at pH 7.5 gave sharper bands and cleaner separation than those run at pH 8.6. Electrophoresis was carried out at room temperature for 4 h at 6 v/cm. Filter paper insertions were used throughout. At the conclusion of a run, strips were halved horizontally, then vertically. One of these quarters was stained by SMITHIES<sup>3</sup> Amido-Schwarz mixture for protein, one by DECLAIR's<sup>7</sup> modified rubanic acid method for copper, one for esterase activity<sup>8</sup> using  $\alpha$ -naphthyl butyrate as a substrate and fast blue RR as a dye coupler, and one for esterase activity after infiltrating the strip for 1 h at 4°C in 10<sup>-4</sup> M eserine sulfate to inhibit cholinesterase activity. The results appear in the Figure. No negative migration occurred in any of the samples, and none of the esterase bands was inhibited by eserine; these are not shown in the Figure.

Although hemolymph proteins were resolved in the two molluscan species studied, none of these was found to give positive copper reactions. Among the Crustacea examined in this study, only *Ocyopode arenarius* and *Achelous depressifrons* displayed a single protein band which was stained by the copper method. In all other species two bands were copper positive. These were usually adjacent bands, of about the same size and intensity of staining, and were the two slowest moving components in the hemolymph. The copper-positive protein bands of *Panulirus argus* and *Geograpsus lividus* were of unequal size and staining intensity. In most instances, esterase activity was associated with the hemocyanin bands, the exceptions being the faster components of *Goniopsis cruentatus* and *Achelous depressifrons* and the slower component of *Pachygrapsus transversus*. It was also noted that zones which displayed esterase activity but which were not stained by Amido-Schwarz appeared in samples of hemolymph from *Pinna carenea*, *Gecarcinus lateralis*, *Ocyopode arenarius*, *Panulirus argus*, and *Achelous depressifrons*. Conversely, Amido-

<sup>1</sup> Contribution number 297 of the Bermuda Biological Station.

<sup>2</sup> This work was supported by grants from the Office of Naval Research and the Muscular Dystrophy Associations of America.

<sup>3</sup> O. SMITHIES, Biochem. J. 61, 679 (1955).

<sup>4</sup> K. R. WOODS, E. C. PAULSEN, R. C. ENGLE, and J. H. PERT, Science 127, 519 (1958).

<sup>5</sup> R. L. ENGLE and K. R. WOODS, in *The Serum Proteins* (Ed. F. W. PUTNAM, 1960), vol. 2, p. 184.

<sup>6</sup> J. R. WHITTAKER, Nature 184, 194 (1959).

<sup>7</sup> W. DECLAIR, Naturwissenschaften 48, 102 (1961).

<sup>8</sup> C. L. MARKERT and R. L. HUNTER, J. Histochem. Cytochem. 7, 42 (1957).