

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. B. MUELLER) und Heilstätte Königstuhl (Direktor: Dr. W. KUHN), Heidelberg

## Papierelektrophoretische Bestimmung der Haptoglobingruppen des Menschen

Von

H. KLEIN und F. KNÜCHEL

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. März 1960)

Die hämoglobinbindende Fraktion der Serumproteine wurde von POLONOVSKI und JAYLE (1938, 1939, 1940) als Haptoglobin bezeichnet. JAYLE und BOUSSIER (1955) — noch eingehender BURTON, GRABAR, BOUSSIER und JAYLE (1954) — konnten enge Beziehungen zwischen Haptoglobin und  $\alpha_2$ -Globulin aufdecken, indem sie die Ergebnisse der titrimetrischen Methode von JAYLE (1939, 1940) mit denen der Immun-elektrophorese verglichen. Ein wesentlicher, nicht nur methodischer Fortschritt war die Bestimmung des Haptoglobins durch Zonenelektrophorese (SMITHIES 1955a) und der Nachweis von 3 genetisch bestimmten Haptoglobingruppen: Hp 1—1, Hp 1—2, Hp 2—2 (SMITHIES 1955 b, SMITHIES und WALKER 1955, 1956)<sup>1</sup>. Die Bedeutung des Haptoglobins, vor allem der Hp-Gruppen, ist seitdem immer mehr erkannt worden.

In Untersuchungen über das elektrophoretische Verhalten des Hämoglobins unter Benutzung des von ARONSSON und GRÖNWALL (1957) angegebenen Puffers konnte beobachtet werden, daß Hämoglobin, das bei der üblichen Zonenelektrophorese mit  $\alpha_2$ -Globulin wandert, unter bestimmten Voraussetzungen als getrennte Komponente erkennbar wird. Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt zu einem sicheren und zugleich einfachen Nachweis der Hp-Gruppen.

### Angewandte Methoden

#### 1. Grundlagen

Die erwähnte Beobachtung, wonach Hämoglobin, sonst elektrophoretisch mit  $\alpha_2$ -Globulin zusammengehend, als getrennte Komponente erkennbar wird, ist in Abb. 1 dargestellt. Einem normalen Serum werden 300 mg-% Hb zugesetzt, dieses nebeneinander mit einem Serum ohne Hb-Zusatz elektrophoretisch getrennt. In dem mit Hb versetzten Serum ist  $\alpha_2$  nicht mehr erkennbar, dagegen entsteht eine

<sup>1</sup> Das umfangreiche Schrifttum über Elektrophorese des Serums ist zusammengefaßt bei G. RIVA (Das Serumweißbild. Bern u. Stuttgart 1958), eine ausführliche Darstellung des gegenwärtigen Standes der Haptoglobin-Forschung bei O. SMITHIES in: Advances in Protein chemistry, Bd. XIV. New York u. London: Academic Press 1959.

kräftig sich anfärrende Zone im Gebiet von  $\alpha_3$  oder zwischen  $\alpha_3$  und  $\beta_1$  bzw.  $\beta_2$ . Eine weitere Komponente ist nach Hb-Zusatz zwischen  $\gamma$ - und  $\beta$ -Globulin sichtbar. Diese überlagert meist das sonst nur schwach erkennbare  $\beta_3$ . Da die letztere in ihrer Wanderung der von reinem Hämoglobin entspricht, konnte angenommen werden, daß die schneller als  $\beta$ -Globin wandernde Hb-haltige Komponente dem

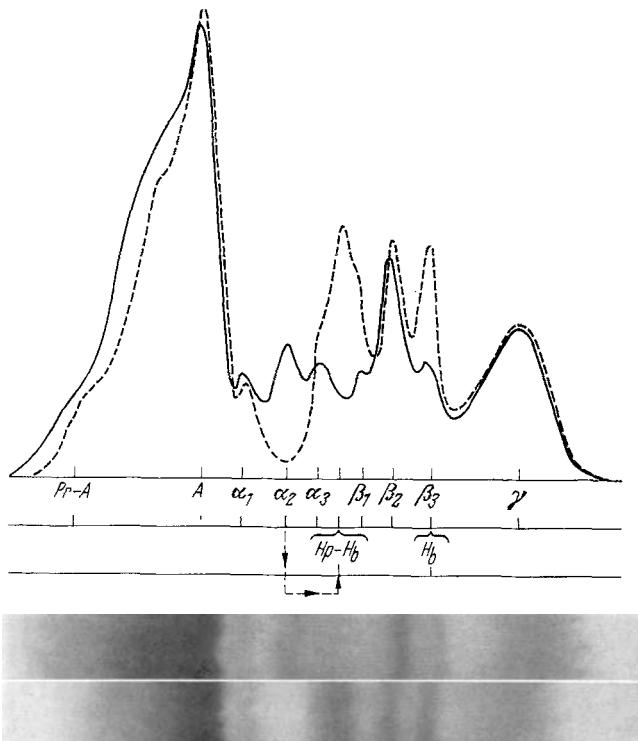


Abb. 1. Papierelektrophorese eines normalen Serums oben ohne, unten nach Zusatz von 300 mg-% Hb:  $\alpha_2$  nach Zusatz von Hb zwischen  $\alpha_3$  und  $\beta_1$  verschoben. Die Analysenkurve zeigt das Serum ohne und mit Hb (punktiert): Der ursprüngliche Gipfel von  $\alpha_2$  ist verschoben, das nicht an  $\alpha_2$  = Hp gebundene Hb mit Gipfel bei  $\beta_3$

an Hp gebundenen Hämoglobin entspricht. Dies läßt sich eindeutiger dadurch nachweisen, daß zunächst auf breiten Streifen getrennt wird, diese aufgeschnitten werden und der eine mit Amidoschwarz oder Azokarmin gefärbt, der andere mit einem Benzidinreagens besprührt wird. Ein nichthämolytisches Serum läßt nach Besprühung mit Benzidin keine Farbentwicklung erkennen, nach Hb-Zusatz färben sich die Streifen zwischen  $\gamma$ - und  $\beta$ -Globulin sowie die zwischen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Globulin stark blau. Obwohl es möglich erschien, aus den genau bestimmten Abständen von  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  — oder auch zu anderen Proteinstreifen im papier-elektrophoretisch getrennten Normalserum — den Hp-Gruppen entsprechende Streifen zu differenzieren, erwies sich dies kaum als vorteilhaft und würde, vor allem bei einem krankhaft veränderten Serum, zu Fehlbestimmungen führen können. Außerdem würden dann die oft wechselnde Papierqualität, geringfügige Änderungen des pH, Raumtemperatur, Trennzeit oder auch Stromschwankungen

störend wirken. Wenn diese Störungen auch bei sorgfältig durchgeföhrten Analysen zu beheben wären, würde ein wesentlicher Vorzug gegenüber der Stärkegel-Elektrophorese kaum bestehen. Eine sichere Unterscheidung sowohl bei normalen als auch bei krankhaft veränderten Seren ist aber eine wesentliche Voraussetzung zur klaren Diagnose, da ein normales Serum vor allem bei Reihen- und forensischen Untersuchungen nicht immer vorausgesetzt werden kann. Außerdem sind mit fortschreitender Erfahrung weitere, von den bisher bekannten abweichende Hp-Gruppen zu erwarten. Hier könnte auf neuerdings beschriebene Hp-Gruppen („Hp 2—1 mod“) — die vorwiegend bei Negern vorzukommen scheinen (SMITHIES 1959) — hingewiesen werden. Die noch nicht eindeutig geklärte Möglichkeit eines angeborenen oder erblichen Hp-Mangels muß ebenfalls erwogen werden.

MORETTI (1957) konnte aus dem Urin von Personen der Gruppe Hp 1—1 ein Haptoglobin mit niedrigerem Molgewicht isolieren als bei Personen mit Hp 2—2. Diese Beobachtung könnte die Vorstellung erlauben, eine Hp 1—1-Hb-Verbindung mit einem Hp 1-Molgewicht von 83000 würde elektrophoretisch schneller als eine Hp 2—2-Hb-Verbindung mit einem Molgewicht von etwa 170000 wandern. Diese Vorstellung wird weiterhin gestützt durch die Ergebnisse von BEARN und FRANKLIN (1959). Für Hp 1—1-Hb wurde eine Sedimentationskonstante von 6 S (SWEDBERG), für Hp 2—2-Hb von 11 S, für Hp 2—1-Hb von 9 S festgestellt. Die heterozygote Gruppe Hp 2—1 wäre demnach nicht einfach eine Kombination der Hp-Gruppen 2—2 und 1—1. CONNEL und SMITHIES (1959) konnten die Unterschiedlichkeit an Dowex 2—x10 rein dargestellten Hp-Gruppen nachweisen. Auch diese Ergebnisse würden ein unterschiedliches papierelektrophoretisches Verhalten der 3 Hp-Gruppen erwarten lassen.

## 2. Durchführung

a) *Puffer*. Es wurde der von ARONSSON und GRÖNWALL (1957) angegebene Puffer folgender Zusammensetzung benutzt: Tris (Trihydroxymethylaminomethan) 60,5 g/Liter; EDTA (Äthyldiamintetraessigsäure) 6,0 g/Liter; Borsäure 4,6 g/Liter pH 8,6. b) *Papier und Kammer*. Um eine zur Abmessung genügend scharfe Trennung zu erhalten, erwies es sich als zweckmäßig, 30 × 8 cm große Papierstreifen nicht horizontal, sondern bogenförmig aufzuspannen. Dies ist am einfachsten dadurch zu erreichen, daß Nylonfäden in 3 cm Abstand in Längsrichtung der Kammer gespannt werden. Die feucht darüber gelegten Streifen sollen einen Bogen mit einem Radius von 30 cm bilden. Der Flüssigkeitsspiegel in den Puffertrögen an der anodischen Seite wurde 1 cm über dem Pufferniveau an der Kathode gehalten. Dadurch wird trotz starker Endosmose in Richtung der Kathode eine zu starke Durchfeuchtung des Papiers vermieden, und es kommt in dem Bereich, in dem eine scharfe Trennung erwünscht ist, zu einem verstärkten Potentialabfall. Das Serum wurde etwa 6 cm oberhalb des Pufferspiegels aufgetragen. Als Papier wurde 2043 b von Schleicher & Schüll benutzt, geeignet waren auch 2043 a, 2045 a und b, aber auch Whatman 1 sowie das Papier von Macherey & Nagel Nr. 2261 c) *Spannung*. Für eine gute Trennung ist der Spannungsabfall entscheidend. Für die Papiere 2043 und 2045 wurde ein Spannungsabfall von 5,5—6,5 V/cm bei einer Trennungszeit (über Nacht) von 16 Std festgestellt. Bei höheren Spannungen sind schärfere Trennungen zu erzielen, doch liegen die Proteinkomponenten dann enger zusammen und deshalb weniger günstig für die — noch zu erörternde — Ausmessung. Bei stabilisierten Gleichstromspannung besteht bei etwa 6 V/cm nach einigen Stunden ein Stromdurchgang von 2,8—3,0 mA für den 8 cm breiten Streifen. Eine kürzere Trennzeit auf Papier erwies sich nicht vorteilhafter, eine Laufzeit von 15—17 Std hat dagegen keine wesentlichen Nachteile. d) *Trennung auf Acetatfolien*. Eine gleichartig konstruierte Kammer wurde auch für Acetatfolien benutzt. Da eine Streifen-

länge von 17:4 oder 15:4 cm ausreicht, konnte eine kleinere Kammer benutzt werden. Bei den oft wechselnden und nicht voraussehbaren Qualität der Folien erwies es sich als zweckmäßig, die Spannung so zu halten, daß der Stromfluß für einen 4 cm breiten Streifen nach 30 min Laufzeit 2,0—2,3 mA, die Trennzeit zwischen 4—6 Std betrug. e) *Färbung.* Zur Färbung eignet sich für Papier und Folie sowohl Amidoschwarz, Azokarmin und Supracenviolett, in der Regel wurde Amidoschwarz benutzt.

### 3. Ausmessung

Da konstante Wanderungsstrecken der einzelnen Proteinkomponenten auf Papier- oder Acetatfolien nicht zu erreichen sind, wurde die Lage von Hp-Hb ähnlich wie in der Papierchromatographie nach Art eines  $R_f$ -Wertes zu bestimmen versucht. Es wurden gemessen: a) Die Strecke vom vorderen Rand von  $\beta_2$  bis zum hinteren Rand von Hp-Hb; b) die Strecke vom vorderen Rand von  $\beta_2$  bis zum hinteren scharf begrenzten Rand der Albumine. Das Verhältnis  $a:b = Q$  entspricht der relativen Wanderung von Hp-Hb.

Durch vergleichende Auswertungen mit bekannten Hp-Gruppen wurden für die verschiedenen Hp-Gruppen folgende  $Q$ -Werte festgestellt:

- Hp-Gruppe 1—1 = 0,35—0,26: Mittelwert = 0,302;
- Hp-Gruppe 2—1 = 0,25—0,16: Mittelwert = 0,178;
- Hp-Gruppe 2—2 = 0,15—0,06: Mittelwert = 0,119.

Die Meßstrecken und -werte sowie die unterschiedliche Lage von Hp-Hb sind in Abb. 2 wiedergegeben. Die angeführten Zahlen wurden aus 500 Einzelbestimmungen berechnet. Die Mittelwerte verhalten sich demnach in den Gruppen 2—2:2—1:1—1 wie 1:1,5:2,5.

### Ergebnisse

In Abb. 3 wird für die 3 Hp-Gruppen ein Beispiel gegeben. Die Unterschiede in der Wanderung der 3 verschiedenen Hp-Hb-Verbindungen werden deutlich. Jeder Streifen enthält oben das Serum ohne Hämoglobin, unten mit Hämoglobin. Die unteren Streifen wurden in der angegebenen — dort eingezeichneten — Weise ausgemessen. Die in Abb. 3 ausgemessenen Abstände konnten auf gut getrennten Elektrophoresestreifen immer als analoge Differenzen nachgewiesen werden. Die Werte für  $Q$  schwanken zwar, ließen sich aber auf Grund von 500 Einzelmessungen so abgrenzen, daß ein Nomogramm aufgestellt werden konnte.

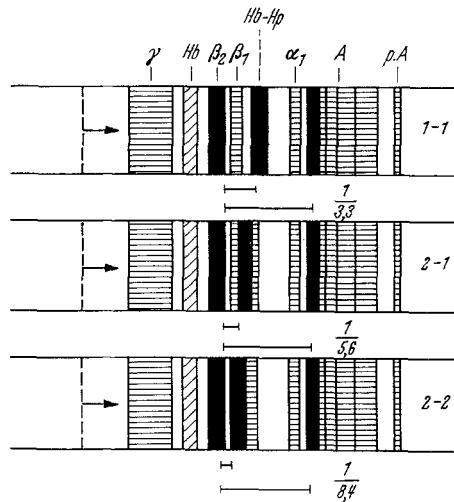


Abb. 2. Hp-Gruppen: Das Schema zeigt die Meßstrecken vom vorderen Rand von  $\beta_2$  bis zum hinteren Rand von Hp-Hb sowie vom vorderen Rand von  $\beta_2$  bis scharf zum hinteren Rand des Albumin

Das in Abb. 4 wiedergegebene Nomogramm dürfte in Reihenuntersuchungen von praktischer Bedeutung sein. Zugleich zeigte es sich, daß die analogen Differenzen der Wanderungsstrecken der verschiedenen Hp-Hb-Gruppen eine sichere Diagnose, die zahlenmäßig zum Ausdruck zu bringen ist, erlauben. Durch Verbindung der in mm angegebenen Entfernung  $\beta_2 - \text{Hp-Hb}$  einerseits mit der Entfernung  $\beta_2 - \text{Albumin}$  andererseits läßt sich die zugehörige Hp-Gruppe ablesen.

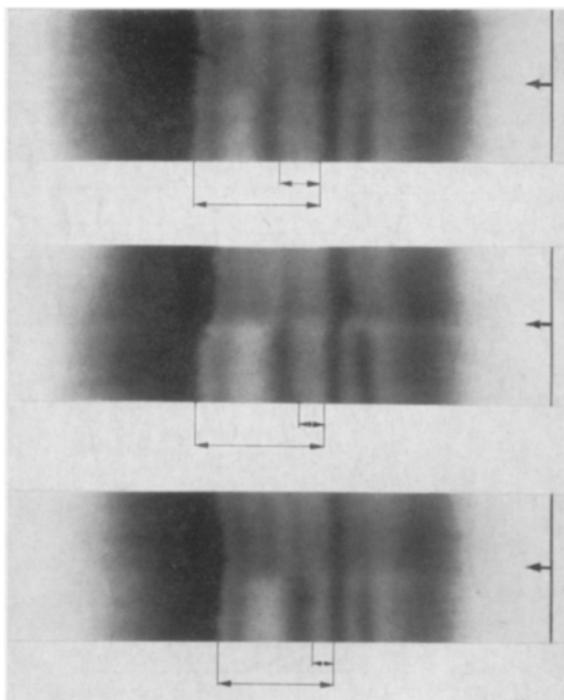


Abb. 3. Hp-Gruppen: Papierelektrophorese. Hp 1—1, 2—1, 2—2 oben ohne, unten mit Hb, mit Eintragung der in Abb. 2 schematisch vorgezeichneten Meßstrecken, auf demselben Papier aufgetrennt

Eine noch schärfere Trennung erreicht man unter sonst gleichen Bedingungen bei Verwendung von Acetatfolie an Stelle von Papier. Auf Grund vergleichender Analysen auf Papier und Folie bot die Trennung auf Folie aber für die praktische Diagnostik keine Vorteile. Lediglich zu Demonstrationszwecken oder wenn nur geringe Serum Mengen verfügbar sind, können Acetatfolien vorteilhafter sein. Die Hp-Gruppen-diagnose kann sowohl unmittelbar abgelesen wie am Nomogramm auf Grund der ausgemessenen Abstände festgestellt werden. Auf gut getrennten Elektrophoresestreifen konnten auf diese Weise immer analoge Differenzen zwischen den 3 Hp-Gruppen nachgewiesen werden. Wenn Q-Werte

vorkamen, die, gewissermaßen als Grenzwerte zwischen 2 Hp-Gruppen, eine sichere Zuordnung nicht erlaubten, handelte es sich um nicht einwandfreie Trennungen zwischen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Globulinen oder um ein pathologisches Serum mit  $\alpha_2$  oder  $\alpha_3$ -Zunahme, gelegentlich auch bei einer  $\beta_1$ -Erhöhung. Außerdem kommt es, wie bekannt, auch vor, daß  $\alpha_2$  fehlt (Lebererkrankungen, Hämolyse). Diese Schwierigkeiten — die auch in der Stärkeelektrophorese beachtet werden müssen und dort nicht einfacher als mit der hier beschriebenen Methode zu erkennen sind — lassen sich dadurch beherrschen, daß nicht nur eine Trennung des Serums mit Hb-Zusatz, sondern auf demselben Streifen eine ohne Hb vorgenommen wird. Durch vergleichende Bestimmung ist eine fragliche Hp-Hb-Komponente, etwa durch starke Zunahme von  $\beta_3$  vorgetäuscht, ebenso zu erkennen wie eine Abnahme von Hp oder gar ein vollkommener Mangel (= Ahaptoglobinämie). Eine graphische Analyse-Bestimmung der Strecken zwischen den Gipelpunkten der einzelnen Fraktionen zur Errechnung des  $Q$  ist für eine Hp-Gruppen-diagnose weniger geeignet. Wenn auch ein auf Acetatfolie getrenntes Serum schärfere Grenzen ergibt, wesentliche Vorteile bestehen gegenüber einer Auftrennung auf Papier nicht, sofern diese, wie beschrieben, durchgeführt wird. Die Trennung muß nur genügend scharf ausfallen.

Nach der beschriebenen Methode sind bisher 703 Untersuchungen durchgeführt worden. Die Ergebnisse sollen hier angeführt werden, weil auch sie einen weiteren Beweis geben für die Sicherheit, mit der die Hp-Gruppen mit dieser Methode bestimmt werden können. In Tabelle 1 sind deshalb eine Reihe verschiedener Untersuchungsergebnisse zusammengestellt. Die eigenen Zahlen — für eine durchschnittliche Population in Deutschland erstmalig — entsprechen in ihrem Häufigkeitsverhältnis der in verschiedenen anderen Bevölkerungen festgestellten Verteilung. Eine Berechnung der Gen-Frequenzen für Hp 1 und Hp 2 käme für die selbstbestimmten Hp-Gruppen zu gleichartigen Frequenzen wie SMITHIES und WALKER (1956), MÄKELÄ, ERIKSSON, LEHTOVAARA (1959), BÜTLER u. Mitarb. (1959). Für Hp 1 kommt eine Frequenz von 0,40, für Hp 2 von 0,60 in Betracht. BÜTLER u. Mitarb. (1959) stellten für Hp 1 eine Frequenz von 33,7 fest, betonten aber, sie könne auf dem selektionierten Material, Blutspender der Gruppe 0 Rh-(cde/cde), beruhen.

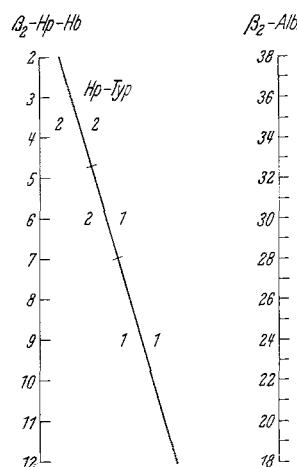


Abb. 4. Nomogramm: Durch Verbindung der in mm angegebenen Distanz  $\beta_2$ -Hp-Hb links, mit  $\beta_2$ -Albumin rechts, ist auf dem mittleren Stab die zugehörige Hp-Gruppe abzulesen.

Tabelle. *Haptoglobin*

Zusammenstellung der Häufigkeitsverteilung der Gruppen 1—1, 2—1 und 2—2 in verschiedenen Ländern sowie die mit der angegebenen Methode in Deutschland festgestellten Zahlen.

Autor	Gesamtzahl	Haptoglobin-Gruppen					
		1—1		1—2		2—2	
		Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
a) Kanada . .	103	16	15,53	54	52,43	33	32,04
b) Schweden . .	46		15		50		35
c) Norwegen . .	500		16		45		38
d) Dänemark . .	2046	328	16,02	967	47,26	751	36,71
e) Frankreich . .	406	62	15,27	202	49,75	142	34,98
f) Schweiz . .	920	140	15,2	449	48,9	331	36,0
g) Deutschland	703	118	16,79	356	50,64	229	32,57

a) SUTTON u. a.; b) LAURELL und GRUBB; c) FLEISCHER und LUNDEVALL; d) GELATIUS-JENSEN; e) MOULLEC u. a.; f) BÜTLER u. a.; g) eigene Zahlen\*.

Die eigenen Beobachtungen geben für eine Beziehung zwischen Hp 1-Gen und 0 Rh-(cde/cde) keine Anhaltspunkte. In allen bisher vorliegenden Untersuchungen — die in einem anderen Zusammenhang ausführlicher berücksichtigt werden sollen — konnte eine Koppelung von Haptoglobin mit anderen genetisch wichtigen Merkmalen nicht beobachtet werden. LAURELL und GRUBB (1957) sahen keine zwischen AB, Le<sup>a</sup>, auch nicht zu den Gm-Serumgruppen. MÄKELÄ, ERIKSSON und LEHTOVAARA (1959) bestätigten dies, indem sie ihre vergleichenden Untersuchungen auf alle praktisch bestimmbarren Blut- und Gruppenfaktoren ausdehnten, außerdem noch die PTC-(Phenylthiocarbamid-)Empfindlichkeit mitprüften, eine Koppelung jedoch nicht feststellen konnten. Da die Ausschlußchance für fälschlich als Väter beanspruchte Männer — auf Grund der Genfrequenzen: 0,4 · 0,6 (1—0,4 · 0,6) — bei 18% liegt, ist das zunehmende Interesse für die Hp-Gruppen verständlich. Eine wesentliche Voraussetzung für eine Anwendung der Hp-Gruppen, besonders in strittigen Abstammungsfragen in Deutschland, ist ein sicherer und zugleich allgemein überprüfbarer Nachweis. Durch die beschriebene papierelektrophoretische Bestimmung dürften die Möglichkeiten, die Hp-Gruppen sicher nachzuweisen, erweitert worden sein.

### Zusammenfassung

1. Zur Bestimmung der Hp-Gruppen des Menschen — bisher nur nach der Zonenelektrophorese im Stärkegel nach SMITHIES möglich — wird nach kurzer Erörterung ihrer Grundlagen eine papierelektrophoretische Methode angegeben.

2. Die Methode erlaubt eine einfache, zugleich sichere und durch Zahlen belegbare Diagnose der Hp-Gruppen.
3. Die Häufigkeit von Hp 1—1, Hp 1—2, und Hp 2—2 bei 703 Bestimmungen betrug 16,8, 50,6 und 32,5%.
4. Die Häufigkeit der papierelektrophoretisch bestimmten Hp-Gruppen entspricht der nach der Zonenelektrophorese festgestellten Verteilung und bestätigt so die Zuverlässigkeit der angegebenen Methode.

### Literatur

- ARONSSON, T., and A. GRÖNVALL: Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis. A new electrophoresis buffer. Scand. J. clin. Lab. Invest. **9**, 338—342 (1957).
- BEARN, A. G., u. E. C. FRANKLIN: Comparative studies on the physical characteristics of the heritable haptoglobin groups of human serum. J. exp. Med. **109**, 55—68 (1959).
- BÜTLER, R., M. METAXAS-BÜHLER, S. ROSIN u. R. WANDREY: Untersuchungen über die Haptoglobingruppen von SMITHIES. Schweiz. med. Wschr. **89**, 1041 bis 1042 (1959).
- BURTIN, P., P. GRABAR, W. G. BOUSSIÈRE et M. F. JAYLE: Etude immunochimique de l'haptoglobine. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **36**, 1029—1035 (1954).
- CONNELL, G. E., u. SMITHIES, O.: Human haptoglobins: Estimation and purification. Biochem. J. **72**, 115—121 (1959).
- FLEISCHER, E. A., u. J. LUNDELL: Proc. of the 6th Congr. Soc. Europ. Haematol. Copenhagen, S. 906. Basel: Karger 1958.
- GALATIUS-JENSEN, F.: On the genetics of the haptoglobins. Acta genet. (Basel) **8**, 232—247 (1958).
- JAYLE, M. F., et G. BOUSSIER: Les seromucoides du sang leur relations avec les mucoprotéines de la substance fondamentale du tissu conjunctif. Expos. ann. Biochim. méd. **16**, 157—159 (1955).
- LAURELL, C.-B., and M. NYMAN: Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. Blood **12**, 493—506 (1957).
- MÄKELÄ, O., A. W. ERIKSSON and R. LEHTOVAARA: On the inheritance of the haptoglobin serum groups. Acta genet. (Basel) **9**, 149—166 (1959).
- MORETTI, J., G. BOUSSIER et M.-F. JAYLE: Nouvelle méthode de purification des protéines par électrophorèse dans un gel d'amidon. Bull. Soc. Chim. Biol. **40**, 59—65 (1958).
- MOULLEC, J., and J. M. FINE: Frequencies of the haptoglobin groups in 406 french blood donors. Nature (Lond.) **184**, 196—197 (1959).
- POLONOVSKI, M., et M. JAYLE: Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydase de l'hémoglobine. C. R. Soc. Biol. (Paris) **129**, 457—460 (1938).
- POLONOVSKI, M., et M. JAYLE: Peroxydases animales, leur spécificité et leur rôle biologique. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **21**, 66—91 (1939).
- POLONOVSKI, M., et M. F. JAYLE: Sur la préparation d'une nouvelle fraction des protéines plasmatiques, l'haptoglobine. C. R. Acad. Sci. (Paris) **211**, 517—519 (1940).

- SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gel: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* **61**, 629—641 (1955).
- SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum protein. *Advances in Protein chemistry*. XIV Academic Press New York, London 1959, 65—113.
- SMITHIES, O., and N. F. WALKER: Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature (Lond.)* **176**, 1265—1266 (1955).
- SMITHIES, O., and N. F. WALKER: Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance. *Nature (Lond.)* **178**, 694—695 (1956).
- SUTTON, A. B., J. V. NEEL, G. BINSON and W. W. ZUELZER: Serum protein differences between Africans and Caucasians. *Nature (Lond.)* **178**, 1287—1288 (1956).
- \* Nachtrag bei der Korrektur: Die Mitteilung von H. BAITSCH und G. MEIER: Blut, 5,302-304 (1959) „Zur Verteilung der Haptoglobintypen in Bayern“ wurde uns erst nach Abschluß des Manuskriptes bekannt.

Professor Dr. H. KLEIN, Institut für gerichtliche Medizin, Heidelberg, Voßstr. 2  
Dr. F. KNÜCHEL, Heilstätte Königstuhl, Heidelberg