

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 Universitätskinder-spitals, Basel (Schweiz), 12. März 1962.*

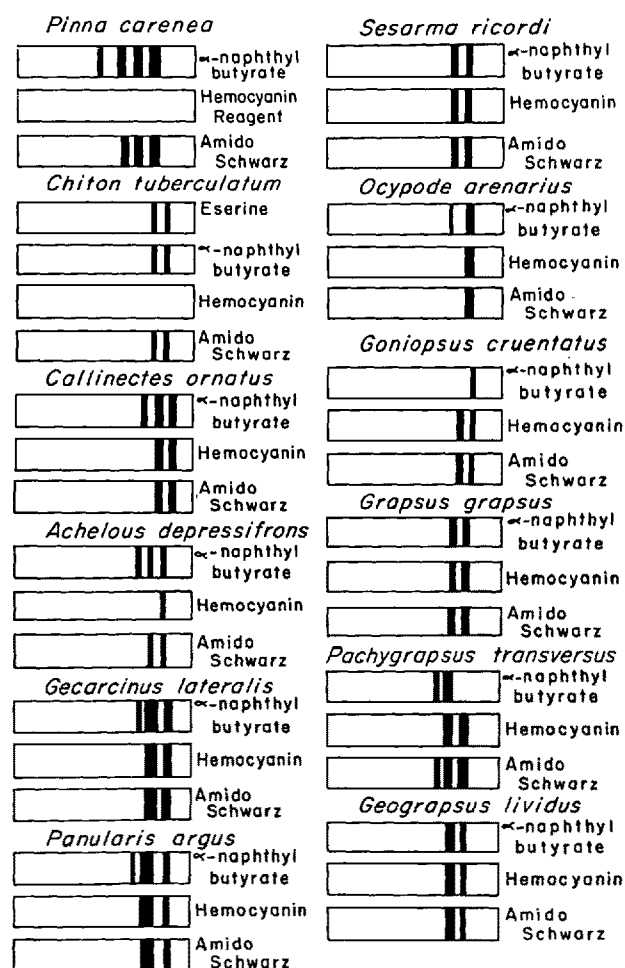
## A Starch Gel Electrophoretic Study of the Hemolymph Proteins of some Bermuda Crustacea<sup>1,2</sup>

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 rubeanic 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 rubeanic 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 *Ocypode 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 *Panularis 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 *Goniopsus 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*, *Ocypode arenarius*, *Panularis 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).

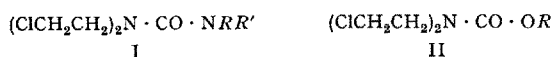
Schwarz stained bands which did not exhibit esterase activity were found in only one instance, in the slowest hemolymph component of *Pachygrapsus transversus*.

At this stage, the principal uncertainty concerning the crustacean hemocyanins is whether the multiple copper-positive protein bands actually represent different molecular species of hemocyanins or dissociation products of a larger hemocyanin polymer. Multiple copper-positive, and presumably hemocyanin, protein bands occur quite commonly in Crustacea. Several aspects suggest a similarity between the copper-positive proteins: the general size and staining intensity of the bands, their adjacency, their consistent pattern of being the slowest moving components in the hemolymph, and the general tendency of these hemocyanin bands to exhibit esterase activity. These characteristics could be shared by different molecular species or hemocyanin dissociation products. Since ERICKSSON-QUESNEL and SVEDBERG<sup>9</sup> have demonstrated that hemocyanins of a number of crustacea display considerable stability up to pH 9.0 and above, it is probable that the multiple copper-positive protein bands resolved from crustacean hemolymph represent distinct molecular species of hemocyanin. More data on the structure and behavior of these fractions will be required, however, before any generalizations may be proposed.

### Nouvelles considérations sur les moutardes azotées

Les urées substituées de formule générale I sont dépourvues tant de l'action cytotatique que de la toxicité des moutardes azotées, mais dans l'organisme, sous l'action des amidases appropriées, quelques-unes de ces urées substituées peuvent être scindées en bis-( $\beta$ -chloréthyl)-amine (nor-HN2), composé nettement cytotatique et relativement peu toxique, et en  $RR'NH$ . Pour que le composé I soit scindé dans la cellule, il faut que  $RR'NH$  soit un des composés organiques qui participent aux réactions de la cellule. Si  $RR'NH$  est un des amino-acides qui prennent part à la construction des protéines de la cellule ou une des bases présentes dans les acides nucléiques, le composé I sera bien mieux scindé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales de l'organisme, car les cellules cancéreuses ont besoin de quantités beaucoup plus élevées d'acides-amino et de bases pyrimidiques et puriques que les cellules normales de l'organisme: la teneur en nucléo-protéides du tissu néoplasique est nettement supérieure à celle du tissu sain correspondant<sup>1,2</sup>.

Des considérations analogues sont valables pour les uréthanes substitués de formule générale II: dans l'organisme, sous l'action des estérases appropriées, quelques-uns des composés du type II peuvent être scindés en nor-HN2 et en ROH; si ROH est un des hydroxy-amino-acides naturels ou une des bases nucléiques, le composé II sera bien mieux scindé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales de l'organisme<sup>2</sup>.



Dans les formules générales I et II, Cl peut être remplacé par Br.

Il est fort probable que même si  $RR'NH$  (ou ROH) est une substance à structure semblable à celle d'un amino-acide (ou hydroxy-amino-acide) naturel ou à celle d'une base nucléique, le composé I (ou II) sera bien mieux

**Zusammenfassung.** Haemolymph Proteine von 10-dekapoden Krebsen aus den Bermudas wurden mit Hilfe der «Starch-Gel»-Elektrophorese untersucht. In acht Arten erwiesen sich die zwei langsamsten Proteinkomponenten als Kupfer-positiv, in zwei Arten wurde nur eine einzige Kupfer-positive Bande ermittelt. Die Esteraseaktivität war mit den meisten Kupfer-positiven Banden verbunden, wobei  $10^{-4}$  Eserinsulfat keine Hemmung der Aktivität herbeiführte. Diese und weitere Versuche legen die Vermutung nahe, dass bei einigen Crustaceen zwei Molekülarten von Haemocyan vorkommen.

R. R. COWDEN<sup>10</sup> and J. R. COLEMAN

*Division of Cell Biology, Institute for Muscle Disease, Inc., New York (USA), and Bermuda Biological Station for Research, Inc., St. George's Nest (Bermuda), January 22, 1962.*

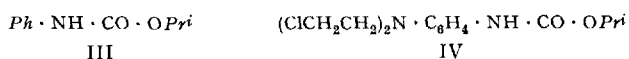
<sup>9</sup> I.-B. ERICKSSON-QUESNEL and T. SVEDBERG, Biol. Bull. 71, 498 (1936).

<sup>10</sup> Present address: Department of Pathology, J. Hollis Miller Health Center, University of Florida, Gainesville (Florida U.S.A.)

scindé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales de l'organisme. En outre, dans ce cas  $RR'NH$  (ou ROH) pourrait être un antagoniste d'un des constituants des nucléo-protéides.

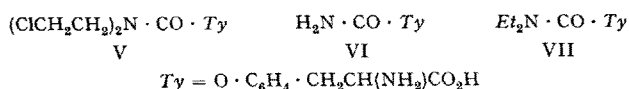
Bref, l'action cytotatique de certains composés des types I et II est en fonction de l'activité enzymatique appropriée de la cellule cancéreuse. Or cette activité enzymatique peut être considérablement exaltée.

En administrant aux animaux cancérisés le composé III et quelques jours plus tard le composé IV, on obtient des résultats nettement supérieurs à ceux obtenus uniquement avec le composé IV<sup>3</sup>. (Pour d'autres exemples, voir<sup>4</sup>.)



En conséquence:

(1) Le traitement avec un uréthane substitué du type II doit être précédé par un traitement de «préparation» avec un uréthane analogue non moutarde azotée. Par exemple, le traitement avec le composé V<sup>2</sup> doit être appliqué après une certaine période de «préparation» avec un des composés VI, VII, etc.; il est bien entendu que pendant le traitement avec le composé V, ainsi que pendant le traitement de «préparation», le malade doit suivre un régime alimentaire très pauvre en L-phényl-alanine et en L-tyrosine.



<sup>1</sup> C.-S. DONGOROZI, Exper. 16, 351 (1960).

<sup>2</sup> C.-S. DONGOROZI, J. Pharm. Belgique 15, 362 (1960).

<sup>3</sup> J. F. DANIELLI, P. J. BARNARD, D. M. COTTON, C. G. DRUCE, L. HAMILTON, and M. S. MAY, Rep. Brit. Emp. Cancer Campgn. 35, 410 (1957).

<sup>4</sup> J. F. DANIELLI, K. A. MONTAGU, P. J. BARNARD, A. PYE, F. W. PRICE, J. L. HAMERTON, and W. A. M. COURTNEY, Rep. Brit. Emp. Cancer Campgn. 37, 575 (1959).