

Zur Chemie der Spermatozoen.

Von

Albert Mathews.

(Columbia University, New-York.)

Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Juni 1897.)

Die Spermatozoen des Lachses zeichnen sich, wie die Untersuchungen Mieschers¹⁾ gezeigt haben, vor allen bisher bekannten Zellen durch die Einfachheit ihrer Zusammensetzung aus. Man kann sogar aus diesen Samenzellen einen Theil, nämlich den Kopf, isoliren und als ein Gebilde charakterisiren, welches im Wesentlichen aus einer chemischen Verbindung, dem neutralen nucleinsauren Protamin, besteht.

Dieser Befund stand bisher ganz vereinzelt da, die Spermatozoen anderer Wirbelthiere, z. B. die vom Stier, Frosch und Karpfen, zeigen complicirtere Verhältnisse, ja es war das Protamin in dem Sperma keiner anderen Thierspecies aufgefunden worden, bis Kossel den Nachweis führte, dass Protamine nicht allein im Sperma anderer Salmoniden (z. B. *Coregonus oxyrhynchus*), sondern auch eines nicht zu dieser Familie gehörenden Fisches, des Störs, vorhanden sind. Dieses Protamin ist freilich, wie Kossel zeigte, nicht mit dem aus Lachssperma identisch, und Kossel gibt ihm deshalb den Namen Sturin.²⁾

Da das «Chromatin», welches den Spermakopf hauptsächlich bildet, im Allgemeinen von den Histologen als Träger

¹⁾ Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel, Bd. 6, S. 138–208, 1874. Archiv f. exp. Pathologie und Pharmakologie, Bd. 37, S. 100–155, 1896.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 176.

der erblichen Eigenschaften und als Hauptsitz der synthetischen und leitenden Energie der Zelle betrachtet wird, so ist die Thatsache, dass der Spermakopf eines Thieres eine so einfache chemische Zusammensetzung haben kann, von bedeutendem Interesse.

Unter den vielen Fragen, welche durch die chemische Untersuchung des Spermas der Lösung näher gebracht werden können, ist eine der wichtigsten die, ob die männlichen Befruchtungszellen, die in morphologischer Hinsicht soviel Gemeinsames besitzen, auch in chemischer Beziehung gemeinschaftliche Eigenschaften darbieten. Wieweit ist das nucleinsaure Protamin in den Organismen verbreitet? Finden sich bei Wirbellosen analoge Verhältnisse vor?

Nach Professor Kossel's Vorschlag unternahm ich die Untersuchung des Spermas eines wirbellosen Thieres: des Seeigels, *Arbacia*. Die Columbia University von New-York stellte gütigst ihren Tisch an der Zoologischen Station in Neapel zu meiner Verfügung und in Folge der freundlichen Hülfe des Herrn Professor Eissig und des Herrn Lo Bianco, welchen ich meinen herzlichsten Dank auszusprechen wünsche, war ich im Stande, grosse Quantitäten von Sperma zu erhalten. Die Arbeit ist durch den beständigen freundlichen Rath und Beistand des Herrn Professor Kossel möglich gemacht worden, welchem ich mich tief verpflichtet fühle.

I. Die Geschlechtsprodukte von *Arbacia*.

Die Hoden der *Arbacia* sind im März und April reif, sie wiegen dann ungefähr zwanzig Gramm. Sie bestehen fast ausschliesslich, wie die folgenden Analysen zeigen, aus reifen Spermatozoen. Es gelingt leicht, die Hoden frei von anderen Geweben zu erhalten. Die Thiere wurden aufgeschnitten, die Hoden herausgenommen; in kleine Stückchen zerschnitten, gewogen und in eine grosse Menge 92% Alkohols gebracht. Nach einigen Tagen wurde der Alkohol abfiltrirt, die Hoden in einem Mörser fein zerrieben und in neuen Alkohol gebracht. Das erste alkoholische Extract und die Hoden in dem zweiten Alkohol wurden nach Marburg geschickt und nach einigen

Monaten untersucht. Der Alkohol wurde abfiltrirt, die Hoden tüchtig in Alkohol geschüttelt, bis das Sperma vollständig von der Hodenwand getrennt worden waren, dann durch Gaze colirt. Die Spermatozoen gehen durch die Maschen hindurch, sie werden aus der colirten Flüssigkeit abfiltrirt, mit Alkohol gekocht und mit Aether ausgezogen. (Die vereinigten alkoholisch-ätherischen Extracte dienen zu den unten angeführten Untersuchungen.) Auf diese Weise konnte ich aus 1¹/₂ Kilo Hoden (feucht gewogen) die Spermatozoen sammeln.

Die frischen Hoden enthalten 80,7% Wasser und 19,29% Rückstand. 218 gr. ungetrocknete Hoden gaben, nachdem sie mit Alkohol-Aether behandelt worden waren, 33,75 gr. getrocknete Spermatozoen und 1,78 gr. Hodenwand. Die getrockneten, fettfreien, reifen Hoden bestehen demnach aus ungefähr 95% reifer Spermatozoen und 5% Hodenwand. Die getrocknete Hodenwand wurde fünfzehn Minuten in etwas Wasser gekocht. Sie gab keine Gallerte, also dürfen wir auf die Abwesenheit von leimgebendem Gewebe schliessen.¹⁾

a) Das Alkohol-Aether-Extract.

Das Alkohol-Aether-Extract wurde bei niedriger Temperatur in vacuo eingedampft. Der Rückstand bestand aus 50,09% wasserlöslichen Substanzen, hauptsächlich anorganischen Salzen, Chloriden, Sulfaten und Phosphaten, und 49,91% in Alkohol-Aether löslichen Theilen. Die letzteren enthalten 16,42% Lecithin, 7,09% Cholesterin und 76,49% Fett, Seife u. s. w. Lecorin war nicht nachweisbar.

b) Die Spermatozoen von Arbacia.

Die frischen Spermatozoen sind weiss, färben sich aber nach längerem Stehen unter Alkohol etwas roth, wahrscheinlich weil sie etwas Farbstoff aus der röthlich gefärbten Hodenwand annehmen.²⁾ Die Spermatozoen erscheinen nach der oben

1) cf. Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie, Berlin 1877, S. 98.

2) Man kann diesen Farbstoff nach vorheriger Behandlung mit einer Säure entfernen. Er ist in Alkohol und Aether löslich; in Wasser und schwachen Säuren unlöslich. Ich konnte genügende Quantitäten für Analysen nicht bekommen.

beschriebenen Behandlung unter dem Mikroskop in Grösse und Gestalt vollständig normal. Sie färben sich, wie die frischen Spermatozoen, in Ehrlich-Biondi'scher Mischung tiefgrün. Ihre Grösse ist nicht bedeutend und der Kopf bildet einen viel kleineren Theil des ganzen Spermatozoons als beim Hering, Lachs, Eber oder Stier. Uebrigens erscheinen die Spermatozoen von *Arbacia* sicherlich ebenso hoch entwickelt wie die der Fische.

Zunächst versuchte ich die Frage zu entscheiden, ob das Sperma von *Arbacia* Protamin enthält.

Zu diesem Zwecke wurde das fein gepulverte Sperma nach Kossel's Methode durch Schütteln mit verschiedenen Portionen 1—2% Schwefelsäure ausgezogen, der Auszug in die vierfache Menge Alkohol gegossen, der weisse, flockige Niederschlag abfiltrirt, mit Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und gewogen. Die folgende Tabelle gibt die Menge der ausziehbaren Substanzen:

1.4118 gr. Sperma	gibt	0.1643 gr.	—	11.63 %
1.5012	0.1359 ..	=	9.05 ..
1.1844	0.1182 ..		9.98 ..
0.9401	0.1057 ..		11.24 ..
1.1873	0.1365 ..		11.49 ..
1.2069	0.1541 ..	=	12.76 ..

Durchschnitt = 11.02 %.

Diese Spermatozoen enthalten also eine verhältnissmässig kleinere Menge durch Säure ausziehbarer Substanzen als die des Störs oder des Lachses, welche nach Kossel und Miescher ungefähr 19% abgeben. Die auf diese Weise aus *Arbacia*-Sperma erhaltene Substanz gibt die Biuretreaction. Millon's Reagens erzeugt eine tiefrothe Farbe, nicht aber eine Fällung. Ammoniak erzeugt in der wässrigen Lösung einen geringen Niederschlag. Die neutrale wässrige Lösung ist durch Ferrocyankalium, Kaliumdichromat, pikrinsaures Natrium, durch alkalisches oder neutrales wolframsaures Natrium und durch Jod—Jodkalium fällbar. In ammoniakalischer Lösung fällt sie Syntonin oder Witte's Pepton. Sie besitzt demnach alle die fällenden Eigenschaften des Protamins und zugleich die Reac-

tionen des Histons. Um nachzuweisen, ob sie aus einer Mischung von Protamin mit Eiweiss bestand oder ob sie ein Histon war, wurde ein Theil davon in Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniak versetzt und filtrirt. Das klare, ammoniakalische Filtrat wurde in Alkohol gegossen, der weisse Niederschlag mit Alkohol ammoniakfrei gewaschen, in Wasser gelöst, diese concentrirte Lösung mit starkem Ammoniak gefällt, von dem geringen Niederschlag abfiltrirt und wieder in Alkohol gegossen. Das schneeweisse Pulver löst sich in Wasser zu einer farblosen Flüssigkeit und ist in concentrirter Lösung nur durch starkes Ammoniak theilweise niederzuschlagen. Eine wässrige Lösung der Substanz, mit Schwefelsäure neutral gemacht, zeigt alle die fällenden Eigenschaften des Protamins, sie gibt aber Millon's-Reaction so stark wie vorher. Ein zweiter Theil wurde in Wasser gelöst und Aether im Ueberschuss zu seiner concentrirten Lösung gesetzt. Hierdurch wird, wie mir Herr Professor Kossel privatim mittheilte, das Protaminsulfat niedergeschlagen. Aus meiner Lösung schied sich aber kein Protamin aus. Die Lösung wurde abfiltrirt, der Aether auf dem Wasserbade verjagt, und amphoter reagirendes phosphorwolframsaures Natrium der neutral reagirenden Lösung hinzugefügt. Der weisse, flockige Niederschlag wurde abgesaugt, zweimal in einem Mörser gut mit Wasser zerrieben, wieder abgesaugt, in ziemlich viel Wasser suspendirt und mit heissem Barythydrat zerlegt. Das Filtrat, von Baryt durch Kohlensäure befreit, wurde eingedampft und abfiltrirt. Die stark alkalische concentrirte Lösung wurde durch Schwefelsäure schwach sauer gemacht, von etwas abgeschiedenem Barytsulfat abfiltrirt und in Alkohol gegossen. Das schneeweisse Pulver besitzt alle die Eigenschaften der ersten Substanz und schlägt Eiweiss nieder wie vorher. Millon's-Reaction ist ungeschwächt.

0,1270 gr. dieses gereinigten Sulfats gab nach Dumas 17,6 ccm. N bei 15° und 747 mm. Bar. d. i. 15,91% N. Die Sulfate der bisher bekannten Protamine geben alle höhere Werthe.

Die vorhergehenden Analysen zeigen, dass die Substanz kein Protamin ist, und weiter, dass sie keine bedeutende Quantität freien Protamins enthalten kann. Dieser Körper, für

den ich den Namen Arbacin vorschlage, ist dem Histon ähnlich und unterscheidet sich von anderen Histonen nur dadurch, dass er nicht durch Ammoniak niedergeschlagen werden kann.

Dass die Spermatozoen der Arbacia kein Protamin oder einen ähnlichen stickstoffreichen Körper enthalten können, wird auch durch ihren niedrigen Stickstoffgehalt wahrscheinlich gemacht. Zwei Bestimmungen der nicht mit Schwefelsäure extrahierten Spermatozoenmasse gaben nach Kjeldahl 15,09% und 15,35% N; nach Behandlung mit Schwefelsäure und Entfernung des Arbacins enthalten sie 14,92% N. Es ist demnach wahrscheinlich, dass sie an der Stelle des Protamins das Arbacin enthalten, welches in Verbindung mit der Nucleinsäure ist, wie die folgenden Analysen zeigen. — —

Meine weiteren Untersuchungen waren auf die Darstellung und Untersuchung der Nucleinsäure aus diesen Spermatozoen gerichtet.

Nachdem die Spermatozoen vollständig mit Schwefelsäure ausgezogen sind, wäscht man sie mit Alkohol und Aether. Der Farbstoff muss auf diese Weise entfernt werden, wenn man ein reines Präparat der Nucleinsäure erhalten will. Die so behandelten Spermatozoen wurden in 0,1—0,05% Ammoniak gebracht und blieben 24 Stunden darin stehen. Sodann wurde die klare Flüssigkeit abfiltrirt und in Alkohol gegossen, der mit Chlorwasserstoffsäure stark sauer gemacht war, der weisse Niederschlag so bald wie möglich abfiltrirt, anfangs mit 60% absolutem Alkohol gewaschen, mit Aether behandelt und über Schwefelsäure getrocknet. Das schneeweisse Pulver wurde in schwach ammoniakalischem Wasser wieder gelöst und wieder wie vorher gefällt. Die Analysen gaben folgende Resultate, welche zeigen, dass die Nucleinsäure der Arbacia mit der Salmonucleinsäure Miescher's in ihrer Zusammensetzung übereinstimmt.

	Berechnet für	Gefunden.
	$C_4, H_{54} N_{14} P_4 O_{27}$.	
P.	9,64	9,59
N.	15,24	15,34

0,1546 gr. brauchten 16,91 ccm. $\frac{1}{10}$ N. Oxalsäure (nach Kjeldahl) = 15,34% N.

Man erhält aber auf diese Weise nur einen Theil der in den Spermatozoen enthaltenen Nucleinsäure, hauptsächlich weil es so schwierig ist, das Arbacin vollständig zu entfernen. Vier Bestimmungen des Phosphors in der ganzen Spermamasse gaben 3,03, 2,99, 2,73 und 2,72^o o, im Durchschnitt 2,86^o o P. Wenn der ganze Phosphor auf die Nucleinsäure zu beziehen ist, so enthalten die Spermatozoen 29,66^o o Nucleinsäure.

3,1524 gr. Sperma gaben aber nach der vorgeschriebenen Methode nur 0,1275 gr. eiweissfreie Nucleinsäure, oder etwas mehr als 4^o o statt 29,66^o o.

Fast aller Phosphor aber ist als ein Nuclein zu gewinnen, wenn man mit 1—2^o o Natronhydrat statt Ammoniak extrahirt, weil die Arbacin-Nucleinsäure-Verbindung in Natronhydrat ziemlich leicht löslich ist.

1,1873 gr. Sperma gaben 0,4742 gr. Nuclein von 4,59^o o P.

1,2064 gr. Sperma gaben 0,4160 gr. Nuclein von 4,83^o o P.

Der Rückstand, welcher in Natronhydrat ungelöst bleibt, enthielt in einem Fall 0,20^o o P., in einem anderen 0,42^o o P. Ein Theil des Phosphors ist in den Filtern der schlecht filtrirenden Natron-Lösung verloren gegangen, ein anderer Theil in die Schwefelsäure übergegangen.

Da durch Ausziehen der Spermatozoen mit Wasser oder Ammoniak vor Behandlung des Spermas mit Schwefelsäure keine Nucleinsäure zu erhalten ist, so muss man voraussetzen, dass die Spermatozoen keine freie Nucleinsäure oder kein in Ammoniak lösliches Nuclein enthalten. Weil freie Nucleinsäure nur nach vorheriger Entfernung des Arbacins zu erhalten ist, ist es wahrscheinlich, dass das Arbacin in Verbindung mit der Nucleinsäure steht. Das Chromatin des Spermakopfes der Arbacia besteht demnach wahrscheinlich, wenigstens theilweise, aus einer Verbindung der Nucleinsäure mit Arbacin.

Die chemischen Verhältnisse der Spermatozoen dieses wirbellosen Thieres bieten daher eine weitgehende Analogie zu dem von Miescher charakterisirten Verhalten der Lachs-Spermatozoen, nur ist an Stelle des Protamins (Salmisins) das

Arbacin vorhanden. Noch grösser ist die Aehnlichkeit der Spermatozoen des Herings mit denen des Lachses, wie die folgenden Untersuchungen zeigen.

II. Das Sperma des Herings.

Professor Kossel stellte gütigst eine Menge frischen Hering-Spermas zu meiner Verfügung, welches ihm in Eis zugeschickt worden war. Das Sperma wurde nach Miescher in destillirtem Wasser drei bis vier Mal centrifugirt und die Köpfe von den Schwänzen getrennt. Der Hauptbestandtheil der Schwänze löste sich und konnte, wenn die Lösung mit Essigsäure schwach angesäuert war, als ein gelb gefärbter, flockiger Niederschlag gewonnen werden. Der Niederschlag ist in einem Ueberschuss von Essigsäure oder Chlorwasserstoffsäure löslich. Er enthält, wie dies auch bei den Untersuchungen Mieschers am Lachs der Fall war, bei weitem die grösste Menge des Lecithin und Cholesterin. Er besteht hauptsächlich aus einem nicht näher untersuchten Eiweisskörper und unterscheidet sich von dem analogen Bestandtheil der Lachs-Spermatozoen-Schwänze dadurch, dass er mit Essigsäure ohne Zusatz von essigsauerm Ammonium fällbar ist. Der Rückstand des alkoholisch-ätherischen Extractes dieser Substanz, welche von einer solchen Menge Sperma, die neun Gramm getrocknete Spermatozoenköpfe geliefert hatte, isolirt worden war, betrug 3,9569 gr. Das Extract enthält 15,13% Cholesterin, 38,66% Lecithin und 46,21% andere Substanzen. Der andere Bestandtheil der Schwänze bildete eine gelatinöse, durchsichtige, etwas faserige Schicht, die sich als besondere Schicht in der Centrifuge über den Köpfen ansammelte und leicht von den Köpfen abgetrennt werden konnte. Diese Schicht enthielt wenig Lecithin oder Cholesterin und bestand hauptsächlich aus einem nicht untersuchten Eiweisskörper.

Die Spermaköpfe stellten sich als ein weisses, schweres Pulver dar. Unter dem Mikroskop betrachtet, scheinen sie ihre Gestalt und Grösse unverändert behalten zu haben. Sie färben sich tief grün in der Ehrlich-Biondi'schen Lösung.

und es ist weder ein Substanzverlust noch eine Veränderung an ihnen nachzuweisen. Die Köpfe wurden dreimal mit kochendem Alkohol und darnach zweimal mit Aether ausgezogen. Der Rückstand der vereinigten Extracte war sehr klein. Präparate I von 9,72 gr. getrockneter Köpfe gab nur 0,2435 gr. in Alkohol-Aether löslicher Substanzen oder 2,46^o o. Präparat II von 12,5 gr. lieferte nur 0,0135 gr. oder 0,10^o o. Es ist demnach wahrscheinlich, dass der Rückstand von Resten des Schwanzes stammt und dass die Spermaköpfe des Herings ebenso wie die des Lachses entweder gar kein Lecithin, Fett oder Cholesterin, oder diese Substanzen in wasserlöslicher Form enthalten.

Die Köpfe der Spermatozoen sind unlöslich in Wasser oder Ammoniak. Sie lösen sich langsam in 5—10^o o Natronhydrat, viel leichter aber, nachdem sie eine kurze Zeit mit Schwefelsäure behandelt worden sind. Die Köpfe geben eine starke Biuretreaction, aber keine Spur von Färbung mit Millons Reagens. Keines von den beiden Präparaten erwies sich als schwefelhaltig. Demnach ist in den Köpfen kein Eiweiss enthalten, und es war nach diesem Verhalten und nach der Analogie mit dem Lachs-Sperma schon von vorneherein wahrscheinlich, dass sie im Wesentlichen aus reinem nucleinsäuren Protamin bestanden, zumal von Professor Kossel in diesen Spermatozoen eine besondere Art des Protamins, das *Clupein*, nachgewiesen ist.¹⁾ Die Analysen bestätigen diese Annahme vollkommen.

C- und H-Bestimmung.

Präparat I.

0,2869 gr. Köpfe gaben 0,4312 gr. CO₂; 0,1457 gr. H₂O.

C = 40,99^o o. H = 5,63^o o.

0,2697 gr. Köpfe gaben 0,4056 gr. CO₂; 0,1415 gr. H₂O.

C = 41,01^o o. H = 5,82^o o.

0,2348 gr. Köpfe gaben 0,3571 gr. CO₂; 0,1242 gr. H₂O.

C = 41,48^o o. H = 5,87^o o.

¹⁾ Sitzungsberichte der Gesellsch. zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften in Marburg. Juli 1897.

Präparat II.

0,2311 gr. Köpfe gaben 0,3499 gr. CO₂; 0,1202 gr. H₂O.
C = 41,29 % H = 5,77 %.

0,2019 gr. Köpfe gaben 0,3039 gr. CO₂; 0,1061 gr. H₂O.
C = 41,05 % H = 5,83 %.

0,2641 gr. Köpfe gaben 0,4012 gr. CO₂; 0,1336 gr. H₂O.
C = 41,43 % H = 5,62 %.

N-Bestimmungen.

Präparat I.

0,1167 gr. Köpfe brauchten 17,49 ccm. ¹/₁₀ Oxalsäure nach Kjeldahl
20,98 % N.

0,1496 gr. Köpfe brauchten 22,29 ccm. ¹/₁₀ Oxalsäure = 20,86 % N.

0,2011 gr. Köpfe lieferten nach Dumas 37,4 ccm. N. bei 16° C., 750 mm. Hg.
21,42 %.

0,2359 gr. Köpfe lieferten nach Dumas 44,4 ccm. N. bei 15,9° C., 743 mm. Hg.
21,44 %.

Präparat II.

0,1661 gr. Köpfe lieferten nach Dumas 30,2 ccm. N. bei 12° C., 736 mm. Hg.
= 20,89 %.

0,3923 gr. Köpfe lieferten nach Dumas 71,7 ccm. N. bei 17°, 746 mm. Hg.
20,78 %.

P-Bestimmung.

Präparat I.

0,2259 gr. gaben, nach Weibull, 0,0512 gr. Mg₂P₂O₇ = 6,33 % P.

0,3253 0,0708 = 6,07 % P.

Präparat II.

0,4178 gr. gaben, nach Weibull, 0,0901 gr. Mg₂P₂O₇ = 6,02 %.

0,2398 0,0504 = 6,09 %.

0,1914 gr. verascht mit Soda und Salpeter gaben 0,409 gr. Mg₂P₂O₇.
5,87 %.

Zusammenfassung:

	Präparat I.				Präparat II.				
C	40,99	41,01	41,48		41,29	41,05	41,43		
H	5,63	5,82	5,87		5,77	5,83	5,62		
N		20,98	20,86	21,42	21,44		20,89	20,78	
P					6,33	6,07	6,02	6,09	5,87

Zieht man einerseits die Formel der Salmonucleinsäure $C_{51}H_{54}N_{11}P_4O_{27}$ und andererseits die von Clupein $C_{30}H_{37}N_{17}O_6$ ¹⁾ in Betracht, so ergibt sich folgende Zusammensetzung:

	Berechnet für die Formel:	Gefunden im Durchschnitt:
	$C_{50}H_{57}N_{17}O_6$	$C_{47}H_{54}N_{14}P_4O_{27}$
C	41.23	41.20
H	5.45	5.75
N	21.30	21.06
P	6.08	6.07
O	25.92	

Die Uebereinstimmung dieser Analysenwerthe mit der Theorie ist genauer, als man sie bei einem thierischen Organ erwarten sollte.

Das Chromatin des Spermatozoenkopfes des Hering, welches nach dem beschriebenen Verfahren isolirt ist, besteht also aus einem nucleinsauren Protamin und ist frei von Eiweiss. Eine quantitative Bestimmung der Nucleinsäure bestätigt diesen Schluss.

0,8385 gr. Spermaköpfe, wasserfrei berechnet, wurden einige Stunden lang unter fortwährendem Schütteln mit mehrfach gewechselten Portionen Schwefelsäure ausgezogen. Die protaminhaltige Lösung wurde abfiltrirt, die Spermaköpfe durch Wasser und Alkohol säurefrei gewaschen und dann in ammoniakhaltiges Wasser gebracht. Die Köpfe schwoilen auf und bildeten eine glashelle Gallerte, welche hier und da weisse Klumpen unveränderter Köpfe enthielt. Nach 48 Stunden ging die Nucleinsäure in Lösung über, und die unveränderten Köpfe setzten sich zu Boden. Die Lösung wurde abfiltrirt und der ungelöste Rückstand getrocknet und gewogen. Er betrug 0,02 gr., und dies muss von den ersten 0,8385 gr. abgerechnet werden. Das Filtrat gab mit Essigsäure einen kleinen Niederschlag und enthielt also noch etwas Protamin. Ohne diesen Niederschlag abzufiltriren, fügte ich 96% Alkohol und Chlörwasserstoffsäure hinzu. Der weisse Niederschlag wurde schnell abfiltrirt, gut mit 90% und absolutem Alkohol gewaschen, mit Aether be-

1) Kossel. Sitzungsber. der Ges. z. Beförd. ges. Naturw. Marburg. 1897.

handelt über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Er betrug 0,5273 gr. fast reine Nucleinsäure. Dies entspricht ziemlich genau derjenigen Menge, welche man nach der Formel $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot C_{10}H_{51}N_{11}P_4O_{27}$ berechnen kann.

Berechnet	Gefunden
63,13%	62,96%

III. Eber- und Stier-Sperma.

Miescher konnte im Stiersperma kein Protamin nachweisen. Die Untersuchung der Spermatozoen eines anderen Säugethieres war demnach wünschenswerth. Durch die Güte des Herrn Professor Kossel erhielt ich einige Gramm getrocknete und mit Alkohol und Aether extrahirte Spermatozoen aus dem Ausführungsgang und Nebenhoden des Ebers. Ich erhielt auch einige frische Hoden, welche eine kleine Menge Sperma lieferten. Protamin war weder in dem ersten noch dem zweiten Präparate nachzuweisen. Lecithinfreies Eber-Sperma enthielt nur 15,79% und 15,58% Stickstoff (nach Kjeldahl). Es ist also höchst unwahrscheinlich, dass diese Spermatozoen eine so stickstoffreiche Substanz wie Protamin enthalten. Mit Schwefelsäure ausgezogen, lieferten sie nur Spuren eines Eiweisskörpers, welcher ausfällt, wenn die saure Lösung neutral gemacht ist. Dieser Körper besitzt keine der fällenden Eigenschaften des Histons oder Protamins.

Ungefähr ein Gramm getrocknetes lecithinfreies Sperma aus dem Ausführungsgang und Nebenhoden des Stiers gab ein ähnliches negatives Resultat. Dieses ist im Einklang mit Miescher's Beobachtungen¹⁾.

Zusammenfassung der Hauptresultate:

a) Die Spermatozoen von Arbacia enthalten kein Protamin, sondern statt dessen einen histonähnlichen Körper, das Arbacin. Das Chromatin der Arbacia-Spermatozoen besteht theilweise, wenn nicht ausschliesslich, aus einer Verbindung von Nucleinsäure mit Arbacin. Die Nucleinsäure hat denselben Phosphor- und Stickstoffgehalt wie Salmonucleinsäure.

¹⁾ Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel. I. c.

b) Die Spermaköpfe oder das Chromatin der Heringsspermatozoen bestehen, nachdem dieselben mit Wasser ausgezogen sind, aus eiweissfreiem nucleinsauren Protamin. Für dieses Chromatin ist die folgende Formel anzugeben:



c) Weder Eber- noch Stier-Sperma enthalten Protamin, oder ein durch Schwefelsäure ausziehbares Histon.

Diese Resultate sind im Vergleich mit denen von Miescher und Kossel nicht uninteressant in Bezug auf die Theorie, dass die erblichen Eigenschaften in dem Chromatin der Spermaköpfe durch besondere chemische Moleküle bedingt werden. Wenn diese Theorie richtig ist, konnte man erwarten, wie von Weismann angenommen ist, dass das Spermatozoen-Chromatin das complicirteste im Körper ist, weil es die Stammoleküle aller anderen enthält: und weiter, dass das Spermatozoen-Chromatin eines höheren Thieres in chemischer Hinsicht complicirter ist, als das eines niederen. Die chemischen Untersuchungen scheinen aber, so weit sie ausgeführt sind, diese Erwartungen nicht zu erfüllen. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass der Kopf des Spermatozoons derjenige Ort ist, wo das einfachste bisher bekannte Chromatin gefunden worden ist, und zwar merkwürdigerweise in dem Sperma eines relativ hohen Thieres, des Fisches. Es ist weiter kaum zu zweifeln, dass Arbacia-Spermachromatin, obgleich von einem viel niedrigeren Thier stammend, complicirter ist, als das des Fisches, welches aus nucleinsaurem Protamin besteht. Denn das Arbacin enthält, wie die Millonsche Reaction beweist, die aromatische Gruppe, die dem Protamin fehlt. Auf die von Schmiedeburg geäußerte Ansicht, dass das nucleinsaure Protamin oder mit anderen Worten das Chromatin nur eine Schutzhülle für den Inhalt des Kopfes darstelle,¹⁾ will ich an dieser Stelle nicht eingehen.

¹⁾ Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 37, Seite 149.