

Ein Beitrag zur Kenntniss der Protamine.

Von

Dr. N. Morkowin.

Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

Der Redaction zugegangen am 22. Juli 1899.)

Nachdem durch die Untersuchungen von Miescher im Jahre 1874 gezeigt war, dass die Spermatozoen des Lachses einen eigentümlichen basischen Körper, das Protamin, enthalten, hat A. Kossel später dargethan, dass wir in dieser Base den Repräsentanten einer Gruppe verschiedenartiger, aber nach dem gleichen Typus gebauter chemischer Produkte vor uns haben. A. Kossel hat ferner erwiesen, dass diese chemische Gruppe der Protamine eine grosse Bedeutung für das Verständniss des chemischen Baues vom Eiweissmolekül besitzt.

Die bisher bekannten Protamine sind folgende: das Salmin aus den Spermatozoen des Lachses (Miescher 1874),¹⁾ das damit höchstwahrscheinlich identische Clupein (Kossel 1897),²⁾ das dem Salmin und Clupein sehr ähnliche Scombrin aus dem Sperma der Makrele (Kurajeff 1898),³⁾ das Sturin aus dem Störsperma (Kossel 1897).⁴⁾ Endlich kann als Zwischenglied den Protaminen und den Histonen das von Mathews (1897)⁵⁾ in hiesigen Laboratorium aus den Spermatozoen eines Seeigels (*Arbacia*) dargestellte Arbacin genannt werden. Im Salmin, Clupein und Scombrin ist nach den Untersuchungen von Kossel nur eine Hexonbase, das Arginin, vorhanden; im Sturin hingegen sind 3 Hexonbasen: Histidin, Arginin und Lysin nachgewiesen worden. Diese Körper enthalten neben den Hexonbasen noch einen nicht ganz aufgeklärten Atomcomplex, der zum Theil zur Bildung einer Amidovaleriansäure Ver-

1) Fr. Miescher, Die histochemischen und physiol. Arbeiten, S. 66. Leipzig 1897.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 66.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 165.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 399.

5) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 524.

anlassung gibt. Alle diese Substanzen enthalten die aromatische Gruppe nicht, geben also auch keine Rothfärbung mit Millon's Reagens. Wohl aber entsteht eine solche Rothfärbung beim Arbacin. Letzteres unterscheidet sich von den bisher bekannten Protaminen auch durch seinen viel geringeren Stickstoffgehalt. Während die Protamine im Durchschnitt 24.5% Stickstoff enthalten, kommt dem Arbacin nur ein Gehalt von 15.91% N zu.

Zur Aufklärung dieser Körpergruppe und ihres Verhältnisses zu den höheren Eiweisskörpern ist die Auffindung von neuen Protaminen und besonders von Zwischengliedern zwischen Protaminen und den höheren basischen Eiweisskörpern, den Histonen, von grossem Interesse. Durch die folgenden Untersuchungen ist ein neues Protamin charakterisirt worden, welches gewisse Eigenschaften mit den höheren Eiweisskörpern gemein hat.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. A. Kossel, dem ich hiermit meinen aufrichtigsten Dank ausspreche für seinen freundlichen Beistand während meiner Arbeit und für das mir von ihm gütigst zur Verfügung gestellte Material, versuchte ich nach der Methode desselben, aus dem Sperma vom Seehäsen (*Cyclopterus lumpus*) einen protaminähnlichen Körper zu gewinnen.

Mir standen 45 g des mit Alkohol und Aether extrahirten Spermas zu Gebote. Diese wurden sechsmal mit einprocentiger Schwefelsäure ausgezogen, indem jedes Mal 4 Stunde lang geschüttelt wurde; das Filtrat wurde mit der dreifachen Menge 95% igen Alkohols versetzt. Nachdem die Fällung des wieder aufgelösten Niederschlages mit Alkohol fünfmal wiederholt worden war, erhielt man eine weisse, klebrige, sehr hygroskopische Masse. Diese wurde in Wasser gelöst und mit pikrinsaurem Natrium gefällt; das erhaltene Pikrat abgetrennt, ausgewaschen und durch Behandlung mit Schwefelsäure und Alkohol in das Sulfat übergeführt. Die Umwandlung in das Sulfat geht sehr schwer und nur bei Anwesenheit kleiner Mengen Alkohol vor sich. Das erhaltene Sulfat wurde mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Die Fällung des Sulfats mit Alkohol wurde viermal wiederholt. Das auf diese Art erhaltene

sulfat wurde im Wasser gelöst in einen Scheidetrichter gebracht und 12 Stunden stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit schieden sich aus der Lösung dunkelbraune Öltröpfchen aus. Diese geringe Menge jedenfalls noch unreiner Substanz wurde entfernt und die Flüssigkeit, welche bei Zimmertemperatur weiter keine Ausscheidung gab, stark abgekühlt. Bei 12° C. begann eine neue Abscheidung, der grössere Theil des Körpers fiel bei 8°—5° C. aus, bei 2° C. war Alles ausgeschieden. Das erhaltene Sulfat, ein dickflüssiges, hellbraunes Oel, welches in Wasser löslich ist, reagirt, bei Abwesenheit freier Mineralsäure, sauer: es gibt eine intensive Millon'sche Reaction, ohne in der Wärme einen Niederschlag zu bilden: letzterer fällt erst beim Abkühlen rosafarben aus. Ferner gibt die Lösung Biuretreaction mit rosa Farbenton: sie wird gefällt durch Alkohol, pikrinsaures Natrium, Ferrocyankalium, Jodjodkalium, Kaliumchromat. Ein Niederschlag entsteht, wenn man die Lösung mit Kochsalz und Ammoniumsulfat sättigt: Ammoniak fällt die Substanz nicht: Salpetersäure bewirkt bei Gegenwart kleiner Mengen Kochsalz keine Fällung. Witte-Pepton ruft bei Anwesenheit von Ammoniak einen Niederschlag hervor.

Für den durch diese Reactionen charakterisirten Körper schlage ich den Namen *Cyclopterin* vor.

Cyclopterinsulfat wurde zuerst im Vacuum, dann bei 100 bis 110° C. getrocknet und analysirt. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0.2035 g Substanz geben	0.3136 g CO ₂	und	0.1264 g H ₂ O
0.4391	0.7220	» CO ₂	» 0.2766 H ₂ O
0.1469	» 28	ccm. N ₂ bei 16.5° C. und 750.5 mm. Bar.	
0.1444	» 28.6	» N ₂ 17°	747
0.2042	» 0.1223	g BaSO ₄	
0.2080	» 0.1218	» BaSO ₄	

C	42.03	41.97		
H	6.90	6.57		
N			22.08	22.67
S				8.19 8.01

Da die Menge des zur Verfügung stehenden Materials

nur eine geringe war, musste ich mich mit diesen Analysen begnügen. Ich verzichte auf die Berechnung einer Formel: die Discussion derselben muss bis zur Gewinnung weiterer Resultate verschoben werden.

Nach diesen Ergebnissen nimmt das Cyclopterin eine isolirte Stellung ein. Es ist eine Substanz, die unzweifelhaft zu den Protaminen gehört. Insbesondere zeigt sie die sehr charakteristische, von A. Kossel aufgefundene Eigenthümlichkeit der Protamine, dass sich das Sulfat als Oel aus der wässerigen Lösung beim Erkalten und auf Zusatz von Aether ausscheidet. Andererseits unterscheidet es sich aber von den bisher bekannten Protaminen wesentlich dadurch, dass es die Millon'sche Reaction gibt und bedeutend weniger Sauerstoff enthält. Von Arbacin unterscheidet es sich durch seinen hohen Stickstoffgehalt, von den meisten Histonen unter Anderem auch dadurch, dass es frei von Schwefel ist, und dass es durch Ammoniak nicht gefällt wird.

Man könnte vielleicht in Anbetracht der Millon'schen Reaction dieses Körpers zu der Ansicht kommen, dass das Cyclopterin eine chemische Verbindung von Protamin mit einem die Millon'sche Reaction ergebenden Propepton oder Pepton darstelle.

Um diese Frage zu entscheiden, stellte ich mir eine Mischung von Protamin mit Propepton und peptonartigen Körpern dar und wies nach, dass das von mir zur Darstellung des Cyclopterins befolgte Verfahren aus diesen Gemischen nicht eine Verbindung von Protamin und peptonartigen Stoffen, sondern reines propepton- und peptonfreies Protamin ergibt.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt. 1,45 g Clupeinsulfat wurde in Wasser gelöst und mit der gleichen Menge einer Lösung von Witte-Pepton versetzt: die Lösung wurde eingedampft; aus der ziemlich concentrirten Flüssigkeit schied sich ein im Wasser lösliches Oel aus. Die Lösung dieses Oels gibt die Millon'sche und die Biuretreaction und wird durch Jodjodkalium, Ammoniak etc. gefällt, besteht somit aus einer Mischung oder einer chemischen Verbindung von Protamin und Pepton. Die wässerige Lösung dieses Oels wurde

mit Alkohol versetzt und der Niederschlag wieder gelöst. Aus dieser Lösung schied sich bei Anwesenheit von Aether bei 2–5° C. ein Oel aus, dessen Lösung alkalisch reagirte, keine Millon'sche Reaction, aber deutlich die Biuretreaction gab, welches ferner durch Jodjodkalium, Ferrocyankalium, Quecksilberchlorid, Kaliumchromat und Alkohol gefällt wurde. Es war also peptonfreies Protamin abgeschieden.

Zu dem gleichen Resultat führte der folgende Versuch. Aus 0.5 g Clupeinsulfat wurde freies Clupein dargestellt. Dasselbe wurde mit einer Lösung von Witte-Pepton gemischt und der erhaltene Niederschlag unter Erwärmen in Wasser gelöst, nach Zusatz von Aether fiel aus dieser Lösung ein Oel aus. Das erhaltene Oel wurde von der Lösung getrennt, in Wasser gelöst und aus dieser Lösung bei 2–5° C. ausgeschieden. Die Lösung dieses Oels färbte sich nicht durch die Millon'sche Reaction, gab eine deutliche Biuretreaction und wurde durch sämtliche Reagentien gefällt, durch welche die Protamine ausgeschieden werden.

Ein dritter Versuch war folgender: Eine Lösung von 0.1 g Clupeinsulfat wurde mit einer Lösung von Histon in 2%iger Schwefelsäure gemischt, die Lösung mit Alkohol versetzt und der erhaltene Niederschlag filtrirt. Nach dem Auswaschen wurde der letztere in heissem Wasser gelöst und eingedampft. Aus der ziemlich concentrirten zurückbleibenden Lösung schied sich unter Zusatz von Aether bei 0° C. ein ganz klares Oel aus. Die Lösung dieses Oels gab keine Millon'sche Reaction, eine deutliche Biuretfärbung, alle Fällungsreactionen der Protamine.

Man erhält also aus dem Gemisch des Protamins mit Propepton und Pepton oder mit Histon nach dem oben beschriebenen Verfahren reines Protamin, keine Verbindung von Protamin mit diesen Stoffen. Die Auffassung des Cyclopterin's als einer lockeren Verbindung von Protamin mit einem peptonartigen Stoff, welche schon durch die Analysenwerthe unwahrscheinlich gemacht wird, ist somit auch nach diesen Versuchen nicht statthaft.

Marburg, 22. Juli 1899.