

Zur Histochemie der Spermatozoen.

II. Mitteilung.¹⁾

Von

H. Studel.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Juli 1911.)

Die mit Wasser gewaschenen, mit Alkohol und Äther entfetteten Köpfe der Heringsspermatozoen hatten, nach der Neumannschen Methode auf Nucleinsäure untersucht, Werte ergeben, die im großen und ganzen mit den von Miescher bei der Untersuchung der Lachsspermatozoen erhaltenen übereinstimmten. Fast der gesamte Phosphor war im Nucleinsäureniederschlag wiedergefunden worden. Die Köpfe, die theoretisch 71,8% Nucleinsäure hätten liefern müssen, unter der Voraussetzung, daß aller Phosphor in Form von Nucleinsäure in ihnen enthalten war, gaben eine Ausbeute von 65,4% Nucleinsäure, so daß nur 6,4%, als Nucleinsäure berechnet, der Bestimmung entgangen waren.

Um nun diese Befunde noch weiter zu stützen, habe ich die Frage von einer anderen Seite her in Angriff genommen. Versucht man, durch Extraktion mit schwachen Mineralsäuren in der Kälte den Spermatozoenköpfen das Protamin zu entziehen, so ist allen bisherigen Untersuchern aufgefallen, daß sich bei weitem nicht diejenige Menge Protamin aus den Köpfen gewinnen läßt, die sich aus der Differenz: Köpfe minus Nucleinsäure berechnen läßt, also 28,2%. Schüttelt man die Köpfe in der Kälte mit 1% Schwefelsäure je eine Viertelstunde lang, so geht schon in das dritte Extrakt nur eine sehr kleine Menge Protamin, dagegen erscheinen schon hier und massenhaft in

¹⁾ I. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 305.

den folgenden Extrakten Nucleinbasen und phosphorsäurehaltige Zersetzungsprodukte der Nucleinsäure, ohne daß weiter Protamin als solches extrahiert wird. Schmiedeberg berechnet aus den Miescherschen Zahlen, daß im günstigsten Falle 19,78% Protamin (aus seinen Zahlen berechnet) extrahiert werden, und meint, das noch fehlende Protamin verbleibe im Rückstand an Nucleinsäure gebunden.

Da man also durch Säureextraktion nicht die Gesamtmenge des Protamins bestimmen kann, habe ich versucht, aus der Menge des Arginins, das man durch Säurehydrolyse aus den Spermatozoenköpfen gewinnen kann, die Menge des Protamins zu bestimmen.

Es wurden 20 g Köpfe von Heringsspermatozoen mit einer Mischung von 120 ccm Wasser und 60 g konzentrierter Schwefelsäure 14 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht, dann von einem minimalen Rückstand abfiltriert und auf 1 l aufgefüllt.

10 ccm, nach Kjeldahl verascht, neutralisieren 24,8 ccm n_{10} -Säure.

10 ccm, nach Kjeldahl verascht, neutralisieren 24,7 ccm n_{10} -Säure.

50 ccm, mit Barytwasser genau neutralisiert und mit Baryumcarbonat im Wasserdampfstrom destilliert, neutralisieren 3,8 ccm n_{10} -Säure.

50 ccm, ebenso behandelt, neutralisieren 3,7 ccm n_{10} -Säure.

50 » » » » 3,4 » » »

Aus der restierenden Flüssigkeit, 830 ccm, wurde sodann nach dem bekannten Verfahren von Kossel und Kutscher, das letzthin von Weiss¹⁾ eingehend beschrieben worden ist, unter sorgfältiger Beobachtung aller für quantitative Bestimmungen nötigen Kautelen eine Argininfraktion gewonnen, die nach ihrem Stickstoffgehalt 3,1 g Arginin enthielt.

Die Flüssigkeit war auf 200 ccm aufgefüllt.

5 ccm davon sättigten nach Kjeldahl 18,2 ccm n_{10} -Säure = 3,164 g Arginin.

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. 52. S. 108.

5 ccm davon sättigten nach Kjeldahl 17,8 ccm n_{10} -Säure = 3,095 g Arginin.

Als Pikrolonat wurden aus der Lösung 7,6 g gewonnen, die 3 g Arginin entsprechen würden, also eine gute Übereinstimmung mit der Stickstoffbestimmung.

Nun enthalten die mit Wasser, Alkohol und Äther behandelten trockenen Spermatozoköpfe im Durchschnitt aus vielen übereinstimmenden Analysen verschiedener Untersucher 20,78% N. Davon entfallen, da die Köpfe 71,81% Nucleinsäure enthalten, 10,87 g N auf die Nucleinsäure, sodaß für das Protamin 9,91 g N übrig bleiben. Da ferner von 100 g Protaminstickstoff 89 g Arginstickstoff sind, so werden von den 9,91 g Protamin-N 8,82 g N auf Arginin entfallen; demnach müßten nach der theoretischen Berechnung 100 g Köpfe 27,39 g Arginin liefern, wenn wirklich außer Nucleinsäure und Protamin keine andere organische Substanz in den wie oben vorbehandelten Köpfen vorhanden wäre.

In dem von mir angestellten Versuch waren im ganzen 830 ccm mit 2,88 g N auf Arginin verarbeitet worden, die unter Zugrundelegen der eben entwickelten Werte 3,8 g Arginin hätten ergeben müssen. Gefunden sind demnach statt der verlangten 27,39% Arginin 21,64% oder statt der verlangten 28,19% Protamin 22,28%.

Gegen die berechnete Menge ergibt sich also immerhin ein Verlust von 5,9% Protamin, den ich bisher nicht habe verringern können, trotzdem ich den oben beschriebenen Versuch dreimal gemacht habe. Merkwürdigerweise ist der Verlust bei der Protaminbestimmung fast ebenso groß wie bei der Nucleinsäurebestimmung (hier 6,4%).

Bei der Säurehydrolyse der Köpfe wurden 2,96% des Gesamtstickstoffs als Ammoniakstickstoff gefunden. Sie sind wohl ganz auf die Nucleinsäure zu beziehen, denn diese liefert für sich allein unter den gleichen Bedingungen 5,20% des Gesamt-N als Ammoniakstickstoff.¹⁾ Auf die ganzen Köpfe umgerechnet, würde das einen Wert von 2,72% geben, der mit dem experimentell gefundenen genügend genau übereinstimmt.

¹⁾ H. Steidel, Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 403.

Der Menge nach wesentliche Bestandteile sind also auch nach diesen Resultaten nicht mehr in den Köpfen der Spermatozoen zu erwarten, und diese Bestimmungen nach neuen Methoden hätten im wesentlichen eine Bestätigung der bisherigen Annahmen gebracht. Selbstverständlich gelten diese Analysen nur für die erschöpfend mit Wasser, Alkohol und Äther behandelten Spermatozoenköpfe. Wählt man eine andere Isolierungsmethode, z. B. Fällung des frischen, mit Wasser verdünnten Spermas mit Essigsäure, so erhält man sofort kompliziertere Verhältnisse durch Beimengung von Eiweißkörpern. Nach Miescher sollen freilich diese Eiweißkörper kein integrierender Bestandteil der Köpfe sein; als Beweis für seine Ansicht gibt er aber nur das unveränderte mikroskopische Bild der Köpfe nach der Wasserextraktion an. Man könnte sich aber wohl vorstellen, daß Eiweiß aus dem Spermatozoenkopf herausgelöst wird, ohne daß die Struktur verändert wird.

Näheres wird man zurzeit kaum darüber sagen können, um so weniger, als außer den Miescherschen Beobachtungen keine Angaben vorliegen. Daß es wesentlich ist, welche Methode man zur Darstellung der Spermatozoenköpfe wählt, habe ich in diesem Frühjahr zeigen können.

Es wurde im März lebendfrisches, reifes Heringssperma bezogen, das sofort nach seiner Ankunft verarbeitet wurde. Die Hoden waren blutleer, ließen aus der Schnittfläche ein weißes, rahmiges Sekret austreten, mikroskopisch zeigten häufige Prüfungen immer das gleiche Bild massenhafter sehr lebhaft sich bewegender Samenfäden, kurz, es waren sämtliche Zeichen der absoluten Reife der Hoden vorhanden.

Die Massen wurden durch ein sehr feines Haasieb getrieben, mit Wasser zu einer dünnen Milch angerührt und nun ein Teil so lange zentrifugiert, bis das immer wiedererneuerte Wasser nichts mehr aufnahm und die Köpfe als schneeweißes Pulver sich in der Zentrifuge absetzten. Dann wurde das Präparat mit Alkohol und mit Äther erschöpfend extrahiert.

Ein anderer Teil der Wasseraufschwemmung der Spermatozoen wurde mit einem kleinen Überschuß von Essigsäure ausgefällt, filtriert, mit schwach saurem Wasser gewaschen und

ebenfalls mit Alkohol und Äther erschöpft. Nun fiel schon bei der Darstellung ohne weiteres auf, daß die mit Essigsäure gefällte Portion immer etwas größere Ausbeuten lieferte, wie der mit Wasser allein behandelte Teil. Als die Präparate dann analysiert wurden, zeigte sich deutlich, daß in die Essigsäurefällung eine nicht zu vernachlässigende Menge Eiweiß hineingegangen war.

Beide Präparate sind weiße, lockere Pulver, das mit Wasser behandelte ist rein weiß, die Essigsäurefällung hat einen Stich ins Gelbliche.

Die Substanz wurde bei 80° vorgetrocknet und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die analytischen Methoden waren dieselben wie in meiner ersten Arbeit.¹⁾

Das nur mit Wasser behandelte Präparat gab folgende Werte:

0,5823 g	gaben	0,1238 g	$Mg_2P_2O_7$	=	6,00%	P
0,4430	»	0,0956	»	=	6,00%	»
0,3833	»	0,0836	»	=	6,07%	»
0,4877	»	0,1067	»	=	6,09%	»
0,1784 g	sättigen	26,7 ccm	n'_{10} -Säure	=	20,50%	N (Kjeldahl)
0,1792	»	26,3	»	=	20,57%	» (»)
0,1684	»	25,2	»	=	20,97%	» (»)
0,1832	»	26,5	»	=	20,27%	» (»)

Die Werte stimmen also mit den bisher bekannten durchaus überein. Anders das Präparat, das mit Essigsäure gefällt war:

0,5182 g	gaben	0,0671 g	$Mg_2P_2O_7$	=	3,60%	P
0,4638	»	0,0594	»	=	3,59%	»
0,5115	»	0,0602	»	=	3,28%	»
0,5290	»	0,0639	»	=	3,36%	»
0,1549 g	sättigen	19,7 ccm	n'_{10} -Säure	=	17,82%	N (Kjeldahl)
0,1116	»	14,2	»	=	17,83%	» (»)
0,1416	»	18,0	»	=	17,41%	» (»)
0,1490	»	19,9	»	=	17,87%	» (»)

Daß es sich bei dem mit Essigsäure gefällten Präparat um eine Beimengung eines Eiweißkörpers handelte, konnte durch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 305.

den positiven Ausfall der Millonschen Probe bewiesen werden. Freilich gab das Präparat sie nicht in der Weise wie die gewöhnlichen Eiweißkörper, stellte man aber eine Aufschwemmung des Präparates in wenigen Kubikzentimetern Wasser, mit 3 bis 4 Tropfen Millons Reagenz versetzt, beiseite, so war nach 2—3 Tagen die Substanz deutlich rot gefärbt, während die nur mit Wasser behandelten Spermatozoenköpfe unter den gleichen Bedingungen nur einen äußerst schwachen rosaroten Hauch zeigten.

25 g des mit Essigsäure behandelten Präparates wurden quantitativ auf Nucleinsäure untersucht und hierbei 90% der theoretisch verlangten Menge an Nucleinsäure gefunden. Der Niederschlag von nucleinsaurem Natron enthielt 8,10% P an Stelle der verlangten 8,40% P.

0,2011 g sättigen 29,4 ccm $n/2$ -Säure (P-Bestimmung nach Neumann).

Der in dem mit Essigsäure behandelten Präparat vorhandene Eiweißkörper fiel größtenteils aus, wenn die Lösung der Köpfe in Natronlauge (bei der Darstellung der Nucleinsäure nach Neumann) mit Essigsäure angesäuert wurde. Die mit Wasser behandelten Köpfe hatten bei der gleichen Behandlung an dieser Stelle keinen Niederschlag gegeben.

Es ist jedenfalls bemerkenswert, daß der Phosphorgehalt der Köpfe nach der Essigsäuremethode um etwa die Hälfte durch die Gegenwart des Eiweißkörpers sinkt. Ob dieser Eiweißkörper den Köpfen oder den Schwänzen angehört, muß vorläufig dahingestellt bleiben; daß er aus der Substanz der Hoden stammt, die der Menge nach gegenüber den Köpfen verschwindend klein war, ist wenig wahrscheinlich, dafür sind die zur Beobachtung gekommenen Mengen zu groß.

Zu meinen in der ersten Mitteilung beschriebenen Versuchen über die quantitative Nucleinsäurebestimmung ist noch nachzutragen, daß sich beim Auflösen der Spermatozoenköpfe in der heißen Natronlauge Ammoniak entwickelt. Da bei der Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit auf Arginin an Stelle desselben Ornithin gefunden wurde, so ist damit bewiesen, daß das Ammoniak dem Protamin und nicht der Nucleinsäure-

