

# Zur Histochemie der Spermatozoen.

## III. Mitteilung.

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Dezember 1912.)

Meine bisherigen Analysen<sup>1)</sup> der mit Wasser zentrifugierten, mit Alkohol und Äther erschöpften Köpfe der Spermatozoen des Herings hatten ergeben, daß übereinstimmend mit den älteren Analysen der Lachsspermatozoen von Miescher<sup>2)</sup> und denen des Herings von Mathews<sup>3)</sup> die Masse fast ganz aus Nucleinsäure und Protamin besteht. Es hatte sich sowohl bei der Verarbeitung auf Nucleinsäure eine fast dem gesamten Phosphorgehalt der Köpfe entsprechende Menge Nucleinsäure gewinnen lassen, als auch war bei der Hydrolyse der Substanz mit Schwefelsäure eine Ausbeute an Arginin erhalten, aus der sich ein Bestand an Protamin bestimmen ließ, der mit dem theoretisch berechneten annähernd übereinstimmte. Die betreffenden Werte, auf die von mir<sup>4)</sup> aufgestellte Nucleinsäureformel  $C_{43}H_{57}N_{15}P_4O_{32}$  bezogen, sind folgende:

	Berechnet:	Gefunden:	Differenz:
Nucleinsäure:	73,46%	68,63%	÷ 4,83%
Protamin:	26,54%	22,28%	÷ 4,26%

Die Frage ist jetzt also, ob das experimentell gefundene Defizit von rund 4—5% der analytischen Technik, die natürlich nicht so exakt arbeitet wie bei einer Metallanalyse, zur

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 305; Bd. 73, S. 471.

<sup>2)</sup> Gesammelte Abhandlungen, Bd. 2, S. 55 und S. 359.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 23, S. 399.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 497.

Last fällt oder ob sich hier noch eine unbekannte andere Substanz verbirgt. Ich habe eine Antwort auf diese Frage zu erhalten versucht, indem ich den Niederschlag analysiert habe, den man erhält, wenn man Salze der Nucleinsäure und des Protamins zusammenbringt. Daß die Nucleinsäure mit Protamin einen in Wasser schwerlöslichen Niederschlag liefert, war schon Miescher bekannt; eine genauere Analyse dieses Niederschlages war aber deswegen unmöglich, weil man damals keine klaren Vorstellungen von den beiden Komponenten, weder von der Nucleinsäure noch vom Protamin, hatte. Heute ist wenigstens die Nucleinsäure ein bekannter Körper, mit dem man genau so sicher operieren kann wie mit irgend einer beliebigen anderen organischen Säure, und auch unsere Kenntnisse vom Protamin sind erheblich fortgeschritten.

Will man übersichtliche Verhältnisse haben, so darf man nicht, wie Miescher es getan hat, beliebige Mengen von Lösungen von unbekanntem Gehalt zusammenbringen: die Nucleinsäure als substituierte Phosphorsäure hat wie die Phosphorsäure die Tendenz, je nach den Bedingungen saure, neutrale oder basische Salze zu liefern. Ich habe mich also im folgenden bemüht, neutrale Salze zu erhalten und unter Berücksichtigung des Umstandes, daß die Nucleinsäure eine vierbasische Säure ist, zu einer Lösung von neutralem nucleinsauren Natron soviel neutrales schwefelsaures Protamin gegeben, daß sich neutrales nucleinsaures Protamin bilden mußte. Dafür hatte ich mir ein Präparat von freier Nucleinsäure aus Thymusdrüsen bereitet, das sorgfältig gereinigt war und exsikkatortrocken folgende Werte lieferte:

0,1524 g	sättigen	14,9 ccm	$n/_{10}$ -Säure	=	13,70%	N (Kjeldahl)
0,1525	»	15,1	»	=	13,87%	» ( » )
0,1494	»	22,3	$n/_{2}$ -Lauge	=	8,27%	P (Neumann)
0,1501	»	22,9	»	=	8,45%	» ( » )

Das Präparat enthielt also im Durchschnitt 13,78% N und 8,36% P; das ist ein Verhältnis von P : N wie 1 : 1,649. Für Nucleinsäure ist nach meiner Formel  $C_{43}H_{57}N_{15}P_4O_{32}$  das Verhältnis P : N = 1 : 1,699 berechnet.

Das für die Versuche benutzte Clupeinsulfat war auf bekannte Weise gewonnen worden, über das in Aceton lösliche Pikrat gereinigt und dann als Sulfat noch mehrere Male als Öl umgefällt worden.

Die mit Alkohol und Äther getrocknete Substanz gab folgende Analysenzahlen:

0,1508 g	sättigen	22,3 ccm	$n_{10}$ -Säure	=	20,71%	N (Kjeldahl)	
0,1496	»	21,9	»	=	20,51%	» ( » )	
0,1501	»	geben	0,0744 g	$\text{BaSO}_4$	=	20,83%	$\text{H}_2\text{SO}_4$
0,1482	»	0,0736	»	=	20,86%	»	

Das Präparat enthält also im Durchschnitt 20,61% N und 20,84%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und die in 100 g enthaltene Menge Schwefelsäure würde einer Menge von 154,7 g wasserfreier Nucleinsäure, resp. 161,7 g des von mir benutzten lufttrockenen Präparates entsprechen.

Dementsprechend wurden 16,2 g Nucleinsäure abgewogen, in ca. 50 ccm kaltem Wasser aufgeschwemmt und mit 42,6 ccm Normalnatronlauge zu einer neutral reagierenden Lösung gebracht. Hierzu wurde eine Auflösung von 10 g Protaminsulfat in ca. 50 ccm Wasser gefügt. Der sofort entstehende schwere weiße Niederschlag wurde nach einiger Zeit von der darüberstehenden leicht opaleszierenden Flüssigkeit abzentrifugiert und so lange mit immer wieder erneuertem Wasser angerührt und zentrifugiert, bis das Waschwasser absolut klar blieb. Zum Schluß wurde die Substanz mit Alkohol und Äther getrocknet. Es resultierte ein feines, weißes, staubendes Pulver in einer Menge von 18,8 g. Bei der Analyse der lufttrockenen Substanz wurden folgende Werte erhalten:

0,1544 g	sättigen	19,8 ccm	$n_{10}$ -Säure	=	17,97%	N (Kjeldahl)	
0,1553	»	20,1	»	=	18,13%	» ( » )	
0,1554	»	15,7	»	$n_{1/2}$ -Lauge	=	5,60%	P (Neumann)
0,1511	»	15,4	»	=	5,65%	» ( » )	

Berechnet man das Verhältnis von Phosphor zu Stickstoff in der Substanz (5,62% P : 18,05% N), so erhält man 1 : 3,211, während in den mit Alkohol und Äther erschöpften



Spermatozoenköpfen (6,42% P und 20,78% N)<sup>1)</sup> das Verhältnis gleich 1 : 3,237 ist.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit schließen, daß die im Anfang besprochenen Verluste von 4—5% Nucleinsäure resp. Clupein bei der quantitativen Analyse der Köpfe auf die Technik zu schieben sind. Dann muß in der Tat in den entsprechend vorbehandelten Spermatozoenköpfen ein neutrales Salz von nucleinsaurem Protamin vorliegen. Aber an einen solchen Schluß knüpfen sich sofort einige neue Fragen.

Erstens muß entweder das Molekulargewicht der Nucleinsäure viermal so groß sein, wie bisher angenommen (1455), oder es bilden 4 Moleküle Nucleinsäure von dem einfachen Molekulargewicht [oder ein Vielfaches davon] mit einem Molekül Clupein ein neutrales Salz. Denn berechnet man sich nach dem Verhältnis der Mengen Nucleinsäure und Clupein im Spermatozoenkopf (73,46% Nucleinsäure und 26,54% Clupein) das Molekulargewicht des Clupeins, so erhält man für Nucleinsäure = 1455 die Zahl 525,7 für Clupein. Nun hat aber schon z. B. ein Diarginylprolin ein Molekulargewicht von 427, ein Diarginylalanin 401 und diese Zahlen sind nach Kossel<sup>2)</sup> auf Grund des Gehaltes z. B. des Salmis an Monoamidosäuren zu verfünffachen, um das einfachste Molekulargewicht des Salmis zu erhalten. Es würde sich also für Clupein die runde Mindestzahl von 2100 ergeben; die gleiche Zahl erhält man, wenn man den von mir abgeleiteten Wert 525 mit 4 multipliziert.

Da nun aber sämtliche Analysen der bisher untersuchten Präparate von Nucleinsäure sich ohne Mühe auf die einfache Molekulargröße 1455 beziehen lassen, so ist an die Möglichkeit zu denken, daß im Verbands der Substanzen des Spermatozoenkopfes die Stoffe in größeren Molekülaggregaten vorhanden sind, die erst bei der Laboratoriumsbehandlung depolymerisiert werden. Als Beweis hierfür kann man einige Unterschiede heranziehen, die sich bei einem näheren Vergleich des nucleinsauren Protamins mit dem trockenen entfetteten Spermatozoen-

<sup>1)</sup> H. Stedel, Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 308.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 301.

kopf ergeben haben. So ist z. B. das Quellungsvermögen der trockenen entfetteten Spermaköpfe in Ammoniaklösung erheblich viel größer wie das des nucleinsauren Protamins. Ferner löst sich das nucleinsaure Protamin in Natronlauge restlos zu einer wasserklaren Flüssigkeit, während bei der Auflösung der Spermatozoenköpfe ein kleiner Rest ungelöst bleibt, der eine weißliche Trübung verursacht, aber durch Zentrifugieren leicht entfernt werden kann (größtenteils Ca-Phosphat). Die beiden Lösungen zeigen nun aber in ihrem optischen Verhalten und besonders in ihrer Viskosität große Unterschiede. Es wurde je 1 g Substanz in 100 ccm Normalnatronlauge gelöst und die Lösung der Spermatozoenköpfe durch Zentrifugieren von dem geringen ungelösten Rückstand befreit. Dann zeigte die Lösung des nucleinsauren Clupeins, im 22 cm langen Rohr untersucht, eine Ablenkung der Polarisationssebene um  $0,5^{\circ}$  nach links, während die Lösung der Köpfe in demselben Rohr nur um die Hälfte [ $0,25^{\circ}$  nach links] drehte. Nach 8 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur ging in beiden Lösungen die optische Aktivität auf  $0^{\circ}$  zurück.

Die Durchflußgeschwindigkeit der alkalischen Lösung des nucleinsauren Clupeins betrug sofort nach der Auflösung im Ostwaldschen Viskosimeter bei  $17^{\circ} 2' 25''$ , während für die Auflösung der Spermaköpfe unter denselben Bedingungen  $12' 38''$  erhalten wurde. Während nun die Durchflußgeschwindigkeit der Lösung des nucleinsauren Protamins während 8 tägigen Stehens bei Zimmertemperatur konstant blieb, nahm diejenige der Spermatozoenköpfe bis auf  $3' 47''$  ab.

Diese wenigen Beobachtungen erlauben gewiß noch keine bestimmten Schlüsse, sie scheinen aber doch darauf hinzuweisen, daß die molekularen Größenverhältnisse der Nucleinsäure und des Protamins im Spermatozoenkopf komplizierter sind wie in dem künstlich hergestellten Salz von nucleinsaurem Protamin.

Eine andere Frage, die sich aus meinen Befunden ergibt, ist die nach dem Stickstoffgehalt des Clupeins. Da in 100 g trockener entfetteter Spermatozoenköpfe 73,46 g Nucleinsäure und 26,54 g Clupein vorhanden sind und da ferner von den 20,78 g Stickstoff, der in 100 g der Köpfe enthalten ist, 10,89 g

auf die Nucleinsäure kommen, so bleiben für das Clupein 9,89 g N übrig, gleich einem Prozentgehalt von 37,26% N im Clupein. Ein so hoher Stickstoffgehalt ist bisher aber niemals im Clupein gefunden worden; nach Kossel<sup>1)</sup> berechnet sich für die einfachste Formel des Salmis ( $C_{81}H_{155}N_{45}O_{18}$ ) 30,80% N, also rund 6% N weniger, wie sich aus meinen Resultaten ableitet.<sup>2)</sup> Hier kann zum Vergleich nicht das von mir benutzte Präparat von Clupeinsulfat herangezogen werden, weil es lufttrocken zur Analyse kam und nicht bis zur Gewichtskonstanz getrocknet war. Daß mein Präparat aber im wesentlichen den bisher analysierten Präparaten von Clupeinsulfat gleich war, ergibt sich daraus, daß z. B. aus den von Goto<sup>3)</sup> publizierten Analysen des salzsauren Platinsalzes des Clupeins sich für das Sulfat ein Verhältnis von Stickstoff zu Schwefelsäure wie 1 : 1 berechnet: das gleiche Verhältnis ist in meinem Präparat gefunden worden. (20,61% N : 20,84%  $H_2SO_4$ .)

Man sieht also, daß die scheinbar so übersichtlichen Verhältnisse der Kernsubstanzen im Spermatozoenkopf durchaus noch nicht nach allen Richtungen klar gestellt sind. Möglicherweise werden erneute Untersuchungen auch noch die eine oder andere Korrektur der von mir mitgeteilten Zahlen ergeben; diese kann sich aber nicht auf die wesentlichen Befunde beziehen, daß rund  $\frac{3}{4}$  des trockenen entfetteten Spermatozoenkopfes des Herings aus Nucleinsäure besteht, während der Rest (rund  $\frac{1}{4}$ ) Clupein ist. Die Verbindung zwischen beiden Körpern findet durch die freien Amidogruppen der Arginylgruppen des Protamins statt. Es ist damit auch ein Verständnis für den Reaktionsmechanismus gegeben, der der Neumannschen Darstellung der Nucleinsäure zugrunde liegt. Denn durch das Erwärmen mit Natronlauge wird die Nucleinsäure nicht ver-

<sup>1)</sup> Biochem. Centralblatt, Bd. 5, S. 5.

<sup>2)</sup> Diese große Differenz beruht gewiß zu einem erheblichen Teil darauf, daß sich hier sämtliche analytischen Fehler summieren. Ändert sich in den entfetteten trockenen Spermatozoenköpfen das Verhältnis P : N nur um ein geringes, so wird der Ausschlag an dieser letzten Zahl schon bedeutend.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 101.



ändert, wohl aber wird aus der Arginylgruppe des Protamins Ammoniak abgespalten und sie in eine Ornithylgruppe verwandelt.<sup>1)</sup> Dieses Desamidoprotamin, das keine freien Amidogruppen mehr besitzt, ist nun aber nicht mehr fähig, mit Nucleinsäure in essigsaurer Lösung einen schwerlöslichen Niederschlag zu geben — es bildet sich beim Ansäuern mit Essigsäure also nucleinsaures Natron, das dann mit Alkohol ausgefällt werden kann.

Ich glaube, daß sich mit Hilfe des bekannten Faktors [der Nucleinsäure] nun auch auf gleiche Weise wie bei den Spermatozoenköpfen in das bisher noch recht dunkle Gebiet der Nucleine resp. der Nucleoproteide Licht bringen lassen. Solche Untersuchungen denke ich selbst noch auszuführen.

---

<sup>1)</sup> H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 476.