

## Weitere Mitteilungen über die Proteine der Fischspermien.

Von  
**A. Kossel.**<sup>1)</sup>

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

Die Untersuchung des Zellkerns hat gelehrt, daß der chemische Aufbau dieses Organs nicht immer der gleiche ist. Im Laufe der Entwicklung können bei gewissen Kerngebilden chemische Umwandlungen eintreten, welche darin bestehen, daß die Monoamidosäuregruppen aus den Kernproteinen teilweise verschwinden. Dadurch wird bewirkt, daß der relative Gehalt an basischen Bausteinen (Arginin, Histidin, Lysin) in den Kernproteinen zunimmt und daß somit auch das ganze Protein basische Eigenschaften erhält. Gleichzeitig mit dieser Veränderung des Proteins wird aber auch die Bindungsform zwischen dem Nucleinsäureanteil und dem Proteinanteil eine andere. In dem Kern der ursprünglichen Zelle, in deren Protein diese chemische Umbildung noch nicht vorhanden ist, ist eine feste, durch verdünnte Säuren bei gewöhnlicher Temperatur nicht lösbare Vereinigung zwischen der Nucleinsäure und dem Protein vorhanden. In denjenigen Kernen jedoch, deren Protein einen basischen Charakter angenommen hat, ist die Vereinigung zwischen der Nucleinsäure und dem Protein eine «salzartige». In den Kernen der letzteren Art kann das basische Protein schon durch verdünnte Mineralsäuren bei gewöhnlicher Temperatur von der Nucleinsäure abgetrennt werden.

Wir haben also, wie ich bereits früher hervorgehoben habe,<sup>2)</sup> je nach der Bindungsweise zwischen der Nucleinsäure

<sup>1)</sup> Vorläufig mitgeteilt in den Sitzungsberichten der Heidelberger Akademie der Wissenschaften am 19. Juni 1913.

<sup>2)</sup> Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiologische Abteilung, Jahrg. 1894, S. 199.

und dem Protein zwei verschiedene Formen der Kernsubstanz zu unterscheiden und ich habe für dieselben die Bezeichnung «dissoziierte» und «nicht dissoziierte» Kerne benutzt.<sup>1)</sup>

In den Organen der Tiere finden sich beide Formen. Typische Beispiele für die dissoziierte Kernsubstanz bieten sich in den roten Blutkörperchen des Vogelblutes, in den Kernen der Thymusdrüse und des adenoiden Gewebes. Aus diesen Kernen wird durch verdünnte Salzsäure ein basischer Protein-stoff losgelöst. Hingegen habe ich in vielen anderen Geweben, z. B. in den Testikeln der Säugetiere — soweit meine Untersuchungen reichen — nur die nicht dissoziierten Kerne vorgefunden. Im Pflanzenreich habe ich bisher überhaupt keine basischen Proteine, also auch keine dissoziierten Zellkerne beobachtet.

Die Umwandlung, welche mit dieser Veränderung der Bindungsweise zwischen Nucleinsäure und Protein Hand in Hand geht, kann verschiedene Grade erreichen. Als den Anfang in dieser Reihe der Umwandlungsprodukte des ursprünglichen Proteins können wir eine Gruppe von Proteinstoffen betrachten, deren ersten Repräsentanten ich in den roten Blutkörperchen des Vogelbluts vorgefunden und mit dem Namen «Histon» bezeichnet habe, später hat sich eine weite Verbreitung dieser Proteine im Tierreiche ergeben. Im Histon ist die Anzahl der Monoamidosäuren relativ verringert, zugleich sind freie Amidogruppen nachweisbar, welche eine basische Reaktion des ganzen Moleküls bedingen.

Am weitesten vorgeschritten ist diese Umwandlung in denjenigen Proteinen, welche der Salmingruppe angehören (Salmin, Clupein, Scombrin, Esocin usw.). Nun ist die Salmingruppe mit der Gruppe der Histone durch eine Reihe von Zwischengliedern verbunden, welche sich durch eine größere Mannigfaltigkeit ihrer Bausteine von den Salminkörpern unterscheiden, ohne jedoch den komplizierten Bau der Histone zu erreichen. Solche sind das Sturin, Percin, Cyclopterin u. a.

Die Aufklärung der Konstitution dieser einfachsten Proteine ist selbstverständlich von prinzipieller Bedeutung für die

<sup>1)</sup> The Harvey Lectures, Philadelphia and Newyork, 1911, S. 50.

Eiweißchemie, neben den chemischen Erwägungen erheben sich aber auch biologische Fragen von allgemeinerem Interesse. Zunächst die Frage nach der physiologischen Bedeutung der eben erwähnten Umwandlung der Kernproteine, die mit dem dissoziierten Zustand der Chromosomenmasse verbunden ist. Es ist bisher nicht möglich gewesen, irgend eine physiologische Funktion zu bezeichnen, welche an den dissoziierten Zustand des Kerns geknüpft ist. Im Gegenteil findet man bei Organen von derselben Funktion bei der einen Tierklasse dissoziierte, bei der anderen nicht dissoziierte Kerne. Ein Beispiel hierfür bietet sich in den Spermien. Diese enthalten bei den Säugetieren und Vögeln undissoziierte Kerne, bei den Fischen hingegen zeigen sie weitestgehende Umwandlung zu dissoziierten Kernen, nämlich die Bildung der Protamine. Quantitativ gering ist die Umwandlung in den Spermien des Frosches, in denen sich nur eine relativ geringe Menge Histon nachweisen läßt, bei gewissen Wirbellosen, z. B. bei Echinoiden tritt der dissoziierte Zustand der Spermienkerne sehr deutlich hervor.

Eine zweite Frage knüpft sich an die genaueren chemischen Untersuchungen über die in den Spermienproteinen enthaltenen Bausteine. Am besten bekannt sind die Stoffe, welche in den Spermienköpfen der Fische auftreten. Nachdem es mir gelungen war, Methoden für die Analyse der Protamine auszubilden, habe ich eine bedeutende Mannigfaltigkeit chemischer Formen auch auf diesem beschränkten Gebiet nachweisen können und es hat sich auf diese Weise die Möglichkeit ergeben, die Speziesesigentümlichkeiten bis in die Chromosomenmasse zu verfolgen. Diese Möglichkeit ergibt aber Angriffspunkte für chemische Untersuchungen, die mit dem Vererbungsproblem in Zusammenhang stehen.

Wir können heute noch nicht entscheiden, welche Eigentümlichkeiten oder welche besonderen Kräfte der Geschlechtszellen die Entwicklung des Keims bestimmen und die Übertragung der Spezies- oder Familieneigentümlichkeiten vermitteln. Wir wissen nicht, wie groß der Anteil chemischer Verhältnisse, etwa der chemischen Struktur der Geschlechtszellen an diesen Funktionen ist. Übt die chemische Struktur einen Einfluß aus,



indem sie die «Assimilation», d. h. die Bildung gleichartiger Körpersubstanz auf einem uns noch unbekanntem Wege vermittelt? Oder wirkt sie in ähnlicher Weise bestimmend auf die Entwicklungsrichtung, wie die Hormone aus Schilddrüse oder Hirnanhang, welche die Entwicklung und das Ebenmaß der Gewebe in einem jungen wachsenden Organismus beeinflussen?

Mag man nun die Bedeutung der chemischen Verhältnisse für die Probleme der Befruchtung und Vererbung höher oder geringer anschlagen, so ist es doch nicht zweifelhaft, daß hier Fragen von allgemeinem Interesse vorliegen. Sind die Proteine in den Spermienköpfen verschiedener Spezies oder Familien nachweisbar verschieden? Kommt den Tieren von ähnlicher morphologischer Organisation, also von naher Verwandtschaft, auch eine ähnliche chemische Beschaffenheit ihrer Geschlechtszellen zu? Diese Fragen sind für die folgenden Untersuchungen bestimmend gewesen, die bisher auf 19 Arten von Fischen und zwar auf 17 Teleostier ausgedehnt worden sind.

Die Vergleichung hat bisher einen ohne weiteres verständlichen Zusammenhang zwischen der chemischen Konstitution der Spermien und der Stellung des betreffenden Fisches im zoologischen System nicht ergeben. Wir finden z. B. die Histone, welche in ihrer Konstitution den ursprünglichen Proteinen näher stehen, sowohl bei Teleostiern wie bei Plagiostomen. Andererseits verläuft bei Cyprinus die Umformung der Proteine bei der Bildung der Spermien in einer Richtung, die bisher ohne Analogie ist, während die chemischen Verhältnisse in den Spermienköpfen von Scomber sich eng an die bei Salmoniden, ferner bei Esox und Clupea gefundenen Verhältnisse anschließen. In manchen Familien sind die Spezies durch scharfe Unterschiede getrennt, z. B. *Scomber scomber* (tyrosinfrei) und *Thynnus thynnus* (tyrosinhaltig), in anderen Familien finden sich Spezies, die das gleiche Protamin in ihren Spermien enthalten. Dies letztere ist z. B. bei zwei Salmoniden, dem Rheinlachs, *Salmo Salar*, und einem californischen Salmoniden, *Oncorhynchus Tschawytscha*, der Fall. Auch bei anderen Familien, z. B. den Perciden, scheint das gleiche vorzukommen, doch ist bisher nur bei den oben erwähnten beiden Salmoniden die



Untersuchung so eingehend durchgeführt worden, daß nach dem heutigen Standpunkte der analytischen Methodik eine Identität der in den beiden Spezies auftretenden Protamine behauptet werden kann. Während wir bei der Vergleichung mit dem zoologischen System auf einzelne Verhältnisse stoßen, welche uns unverständlich sind, hat sich anderseits eine unerwartete Gesetzmäßigkeit im chemischen Aufbau mehrerer aus verschiedenen Unterklassen und Familien der Fische entstammenden Protamine ergeben, welche weiter unten ausführlicher besprochen wird.

Bisher war es nicht möglich, alle Bausteine der Protamine qualitativ und quantitativ festzustellen. Wegen der Schwierigkeit der Beschaffung genügender Materialmengen ist die Untersuchung im wesentlichen auf die leichter bestimmbaren basischen Bausteine beschränkt worden. Einige Angaben über die Monoamidosäuren der neu untersuchten Protamine finden sich in der folgenden Mitteilung von A. Kossel und F. Edlbacher.

Während bei einzelnen Spezies, z. B. beim Rheinlachs, die Umwandlung der Proteine beim Reifen der Testikel in der Weise erfolgt, daß nur ein einzelnes, scharf definiertes Produkt (Salmin) gebildet wird, entstehen bei anderen Fischen zwei oder vielleicht sogar mehrere basische Produkte nebeneinander. Dies ist z. B. beim Karpfen der Fall. Die völlige Trennung dieser in demselben Sperma nebeneinander entstehenden Protamine gelingt nicht immer, und es bleibt daher oft eine Unsicherheit darüber, ob die Protamine wirklich chemische Individuen sind. So wichtig die Entscheidung dieser Frage auch vom chemischen Standpunkt aus ist, so ist sie doch für manche biologische Betrachtungen erst von sekundärer Bedeutung. Für die Beurteilung der Spezieseseigentümlichkeiten ist das Vorhandensein und die Menge der verschiedenen Proteinbausteine die Hauptsache, — erst in zweiter Linie steht die Frage, ob diese Bausteine zu einem oder zu mehreren größeren Verbänden zusammengefaßt sind.

In der letzten Zeit ist es mir möglich gewesen, die Analysen auf eine Reihe von bisher nicht untersuchten Spezies auszudehnen. Durch die bereitwillige Hilfe des Bureau of

Fisheries in Washington und besonders durch die Freundlichkeit des Herrn H. M. Smith daselbst habe ich die abgestrichene Milch von mehreren Perciden und Salmoniden zugesandt erhalten, und es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle meinen Dank für die außerordentlich wertvollen Sendungen auszusprechen. Ebenso danke ich den Herren Professor Benedicenti in Genua, Professor Pauly in Würzburg, den Herren Penco in Isola piana, Professor Raffaele in Palermo, Dr. Sanzo in Messina und Professor A. E. Taylor in Philadelphia für die freundlichst gewährte Vermittlung und Hilfe bei der schwierigen Beschaffung des Materials.

*Perca flavescens*<sup>1)</sup> («Yellow perch»)  
(Potomac river, Nord-Amerika.)

Zu den Versuchen diente das Ende März entnommene Sperma, welches in 70%igem Alkohol konserviert war. Die Darstellung des Protamins, welches als «Percin» bezeichnet werden mag, war die früher von mir beschriebene. Die Abscheidung des Percinsulfats als Öl gelang leicht, das Sulfat erwies sich als wenig löslich in kaltem Wasser. Die Ausbeute betrug 10 g.

Das Percin gibt die gewöhnlichen Protaminreaktionen, keine Rotfärbung mit Millons Reagens, wohl aber einen roten Niederschlag mit Diazobenzolsulfosäure bei Gegenwart von Natriumcarbonat. Aus diesem Verhalten mußte auf die Gegenwart von Histidin geschlossen werden. Die Tryptophanreaktion nach Hopkins und Cole ist negativ, auch ist kein bleischwärzender Schwefel vorhanden. Eine Bindung des Formols ist nicht nachweisbar, demnach gehören die freien Amidogruppen dieses Proteins ausschließlich dem Arginin an.<sup>2)</sup> In Übereinstimmung damit wurde durch die hydrolytische Spaltung die Abwesenheit des Lysins festgestellt.

5 g Percinsulfat wurden nach den im hiesigen Laboratorium gebräuchlichen Methoden — die von F. Weiss aus-

<sup>1)</sup> Vom Bureau of Fisheries in Washington übersandt.

<sup>2)</sup> Vgl. Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 457 (1912), Bd. 78, S. 402 (1912), Bd. 81, S. 274 (1912).

fürlicher beschrieben sind<sup>1)</sup> — der Hydrolyse und quantitativen Untersuchung unterworfen. Bei der Spaltung des Percins mit wässriger Schwefelsäure trat die Bildung von Huminstoffen, wie sie bei komplizierteren Proteinen beobachtet wird, nicht ein, die Reaktionsflüssigkeit blieb klar und war nur schwach gelblich. Auch fand keine Ammoniakabspaltung statt. Die quantitativen Verhältnisse der Spaltungsprodukte ergeben sich aus folgender Zusammenstellung.

Basenstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs.

Ammoniak	0
Im Barytniederschlag zurückgeblieben	1,7
Durch Silbersulfat und Barythydrat fällbar	85,5
Darin Histidin gefunden	5,6
» Arginin gefunden	78,1
» Lysin	0
Im Filtrat des Silberniederschlags gefunden	9,8
(Monoamidosäurestickstoff.)	

Die quantitative Bestimmung des Arginins und Histidins wurde durch Kjeldahl-Bestimmung in den entsprechenden Fraktionen ausgeführt. Die Histidinfraktion gab den charakteristischen Niederschlag mit Pikrolonsäure, die aus dem Niederschlag nach Entfernung der Pikrolonsäure wiedergewonnene Base gab die Paulysche Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure und die Knoopsche Bromreaktion, auch lieferte sie mit Salzsäure ein gut krystallisierendes Salz.

Die Analyse des Percins ergibt, daß dieser Körper der Repräsentant einer bisher nicht bekannten Klasse von Protaminen ist. Um so mehr ist es bemerkenswert, daß ich bei der folgenden Spezies, die ebenfalls zu den Perciden gehört, ein Protamin vorfand, dessen Zusammensetzung innerhalb der analytischen Fehlergrenzen mit dem Percin übereinstimmte.

Stizostedion vitreum («Pike perch».)<sup>2)</sup>

(Nord-Amerika.)

Das im Mai entnommene Sperma war in Alkohol konserviert, die mit Alkohol und Äther erschöpfte Spermamasse

<sup>1)</sup> F. Weiss, Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 108 (1907).

<sup>2)</sup> Vom Bureau of Fisheries in Washington übersandt.



wog nach dem Trocknen 89 g, sie wurde ebenso wie das vorhergehende Präparat nach dem üblichen Verfahren auf Protamin verarbeitet. Die Ausbeute betrug 2,5 g Protaminsulfat. Die Eigenschaften des Protamins stimmten genau mit denen des Percins überein. Bei der Hydrolyse ergaben sich folgende Zahlen.

Basenstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs.

Ammoniak	0
Durch Silbersulfat und Barythydrat fällbar	85,2
Darin Histidin gefunden	6,7
» Arginin       »	76,3
» Lysin        »	0
Im Filtrat des Silberniederschlages gefunden	10,7
(Monoamidosaurestickstoff)	

Die Übereinstimmung dieser Analyse mit den bei der Untersuchung des Spermas von *Perca flavescens* gefundenen Zahlen ist eine derartige, daß es gerechtfertigt ist, die beiden Protamine bis auf weiteres mit dem gemeinsamen Namen Percin zu bezeichnen — man wird freilich die Möglichkeit zugeben müssen, daß weitere Untersuchungen noch Unterschiede zwischen beiden aufdecken.

*Thynnus thynnus*.<sup>1)</sup>

(Thunfisch, Mittelmeer)

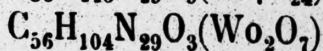
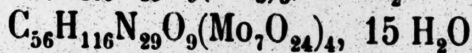
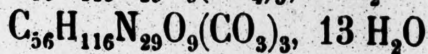
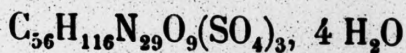
Eine wertvolle Untersuchung über die basischen Bestandteile des Spermas vom Thunfisch ist von Ulpiani<sup>2)</sup> im Jahre 1902 veröffentlicht worden. Ulpiani gewann den basischen Protein-stoff dieser Organe, indem er zunächst das durch Extraktion der Testikel gewonnene Sulfat durch Alkohol niederschlug, aus diesem durch Ammoniak die freie Base abschied und letztere zum Schluß wieder in das Sulfat überführte. Dieses wurde dann in bekannter Weise durch Abscheidung aus der abgekühlten wässerigen Lösung gereinigt.

Das so gewonnene Sulfat gab Biuretreaktion und Mil-lonsche Reaktion, in neutraler Lösung Fällungen mit den Alkalisalzen der Phosphorwolframsäure, Ferrocyanwasserstoff-

<sup>1)</sup> Von Herrn Professor Dr. Raffaele und Herrn Penco übersandt.

<sup>2)</sup> Gazzetta chimica italiana, Jahrgang 32, Bd. 2, S. 215, 1902.

säure, Pikrinsäure und Chromsäure. Die Base gab ferner einen Niederschlag mit Witte-Pepton. Die Analysen wurden am Sulfat, Carbonat, Molybdat und Wolframat ausgeführt und ergaben die folgenden Formeln



Die Hydrolyse und die Aufteilung der hydrolytischen Spaltungsprodukte wurde von Ulpiani nach dem älteren von mir angegebenen Verfahren ausgeführt und der Verfasser stellte auf diese Weise das Vorkommen des Arginins fest, an Stelle des Histidins war eine stickstoffreichere Base nachweisbar. Lysin wurde nicht gefunden, statt dessen soll eine andere bisher nicht identifizierte Base vorkommen. Ulpiani zieht aus seinen Untersuchungen den Schluß, daß die aus den Thunfischspermien erhaltene Base zur Gruppe der Histone zu rechnen ist, wenn sie auch einige Abweichungen von dem Histontypus zeigt.

In demselben Sinne spricht sich auch Dezani<sup>1)</sup> aus, welcher einige Jahre später die Thunfischtestikel anscheinend nach einem ähnlichen Verfahren verarbeitete. Dezani benutzte für die Trennung der basischen Spaltungsprodukte das später von mir beschriebene Verfahren und fand Histidin, Arginin und Lysin. Dezani gab die Resultate seiner quantitativen Bestimmungen folgendermaßen an.

Basen-Stickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs  
(nach Dezani):

Ammoniak	6,79
Histidin	3,86
Arginin	37,02
Lysin	2,7

Auf Grund dieser letzteren Ergebnisse, besonders des niederen Argininstickstoffs müßte der aus den Thunfischspermien

<sup>1)</sup> Giornale della R. Accademia di Medicina di Torino, Jahrgang 71, 1908, S. 114.

gewonnene Körper in der Tat entsprechend der Ansicht von Ulpiani und Dezani zu den Histonen gerechnet werden. Das Vorkommen eines Histons in den reifen Spermienköpfen eines Scombriden ohne gleichzeitiges Vorkommen eines Protamins wäre aber sehr auffallend. Bringt doch ein anderes Mitglied der Familie der Scombriden, nämlich *Scomber scomber*, die gewöhnliche Makrele, die einfachste Form eines Protamins, das Scombrin hervor.

Ich habe das Thunfischsperma daher einer erneuten Untersuchung unterworfen und diese hat das Vorkommen eines typischen Protamins in den Testikeln des Thunfisches ergeben. Daneben ist eine zweite Substanz vorhanden, deren Bearbeitung noch nicht abgeschlossen ist. Der letzterwähnte Körper besitzt eine schleimige Beschaffenheit und erschwert dadurch die Darstellung des Protamins, welche in der früher beschriebenen Weise ausgeführt wurde. Die Filtration des durch Alkohol gefällten und durch Wasser gelösten Sulfats ging nur langsam vonstatten, hierbei blieb die schleimige Substanz größtenteils auf dem Filter zurück.

Beim Abkühlen der wässrigen Lösung des Sulfats schied sich zunächst die schleimige Beimengung ab, sie wurde auf Grund ihrer geringeren Löslichkeit von dem typischen Protamin getrennt. Für letzteres schlage ich den Namen «Thynnin» vor.

Ulpianis Beschreibung der Eigenschaften des von ihm dargestellten basischen Proteins fand ich im wesentlichen am Thynnin bestätigt. Mein Präparat gab Biuretreaktion und in ammoniakalischer Flüssigkeit einen Niederschlag mit Wittepepton, auch die ölige Abscheidung beim Abkühlen der wässrigen Lösung des Sulfats. Mit Diazobenzolsulfosäure trat die von Pauly beschriebene Rotfärbung ein. Bei der Hydrolyse erhielt ich das folgende Resultat:

Prozente des Gesamtstickstoffs.

Ammoniak	0
Im Barytniederschlag zurückgeblieben	7,3
Histidinstickstoff	0



Argininstickstoff	79,5
Lysinstickstoff	0
Monoamidosäurestickstoff	11,0
Darin Tyrosinstickstoff	0,6.

Da Ulpianis Ergebnisse das Vorhandensein von mehreren basischen Stoffen in dem durch Silbersalze bei Gegenwart von Baryt fällbaren Anteil vermuten ließen, habe ich das aus dem Silberniederschlag erhaltene Arginin auf seine Reinheit geprüft. Das Carbonat, welches nach dem Einengen sofort krystallisiert war und dessen Menge durch die Kjeldahl-Bestimmung festgestellt war, wurde in wenig Wasser gelöst und mit Salpetersäure schwach sauer gemacht. Die Lösung wurde genau auf 50 ccm aufgefüllt und im Polarisationsapparat untersucht. Sie enthielt 7,4% Argininnitrat und ergab eine Drehung von  $= + 0,70^\circ$ . Hieraus berechnet sich  $[\alpha]_D = + 9,4$ . Dies stimmt mit einer Feststellung von Gulewitsch<sup>1)</sup> überein, welcher für eine 10,2% ige Lösung des Argininnitrats  $[\alpha]_D = + 9,3$  fand.

Das Fehlen des Histidins unter den Spaltungsprodukten des Thynnins ließe sich mit Sicherheit durch die Paulysche Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure feststellen. Der durch das Silberbarytverfahren fällbare Anteil der hydrolytischen Spaltungsprodukte gab diese Probe nicht. Ihr positiver Ausfall in dem ursprünglichen Thynnin ist daher ausschließlich auf die Gegenwart des Tyrosins zu beziehen.

Die vom Silberbarytniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wurde nach der Entfernung von geringen Mengen überschüssigen Silbers eingedampft. Es schieden sich die typischen Krystalle des Tyrosins ab, welche auf gewogenem Filter gesammelt, getrocknet und gewogen wurden. Nach der Entfernung der Hauptmenge des Tyrosins konnte durch Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Schwefelsäure noch eine sehr geringe Fällung hervorgerufen werden, in der jedoch kein Lysin nachgewiesen werden konnte. Aus der vom Phosphorwolframsäureniederschlag abfiltrierten Lösung wurde noch eine zweite

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 190 (1899).

geringere Krystallisation von Tyrosin erhalten, deren Gewicht ebenfalls festgestellt wurde. Weitere Angaben über die Monoamidosäuren aus Thynnin sind in der folgenden Mitteilung von A. Kossel und F. Edlbacher enthalten.

Der Beweis für die Zugehörigkeit des Thynnins zur Protamingruppe wird durch folgende Beobachtungen gegeben:

1. Durch den hohen Prozentgehalt an Arginin (vgl. oben S. 173).

2. Durch das Fehlen des Histidins und Lysins. Bisher ist kein histonähnlicher Körper bekannt, welcher ausschließlich Arginin als basischen Bestandteil enthält.

3. Durch die ölartige Abscheidung des Thynninsulfats aus wässriger Lösung, welche bisher bei anderen Proteinen als bei Protaminen noch nicht beobachtet ist.

4. Durch das Verhalten zu Pepsinsalzsäure. Wie ich früher dargetan habe, wird Histon durch Pepsinsalzsäure in Histo-pepton übergeführt, die Protamine jedoch bleiben unangegriffen. Letztere bewahren daher nach der Pepsinwirkung ihre Fähigkeit, in ammoniakalischer Lösung mit Witte-Pepton einen Niederschlag zu geben im Gegensatz zu den Histonen, welche diese Eigenschaft verlieren. Eine Ausnahme von dieser Regel habe ich nur bei zwei Selachiern (*Centrophorus* und *Hexanchus*) gefunden. Die aus ihren Testikeln erhaltenen Histone bewahren auch nach der Einwirkung der Pepsinsalzsäure ihre Fähigkeit Witte-Pepton zu fällen.

Für die Untersuchung dieses Verhaltens wurde 0,25 g Thynninsulfat in 30 ccm einer gut wirksamen Pepsinsalzsäure gelöst. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle 0,25 g Histon aus Dorsch-testikeln mit der gleichen Menge Pepsinsalzsäure versetzt. Beide Lösungen wurden bei Brütofentemperatur digeriert, nach 4 Tagen mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit einer ammoniakalischen Lösung von Witte-Pepton versetzt. Die Lösung des Thynnins gab einen kräftigen Niederschlag, die des Dorschhistons blieb unverändert, letztere war also unter Peptonbildung umgewandelt worden, das Thynnin war unangegriffen.

Wenn nun auch das Thynnin zu den Protaminen zu rechnen ist und somit den basischen Protaminen in den Sperma-

köpfen der übrigen Scombriden näher gerückt ist, so ist doch durch das Vorkommen des Tyrosins im Thynnin ein Unterschied gegenüber dem Scobrinn vorhanden. Wahrscheinlich sind auch die quantitativen Verhältnisse des Arginins verschiedene.

### *Pelamys Sarda* (Mittelmeer).<sup>1)</sup>

Die Untersuchung der Testikel dieses Scombriden konnte nur in sehr unvollkommener Weise ausgeführt werden, da die Menge des mir zu Gebote stehenden Materials eine geringe war. Immerhin zeigte sich, daß aus den Testikeln dieser Spezies ein Protamin zu gewinnen ist, welches dem Thynnin mindestens sehr ähnlich ist. Dasselbe bewahrt auch nach mehrtägiger Einwirkung von Pepsinsalzsäure seine Fähigkeit, in ammoniakalischer Lösung Witte-Pepton zu fällen, gibt die Millonsche Reaktion und die Biuretreaktion und enthält kein Histidin.

Für die Aufsuchung des Histidins bediente ich mich des Verfahrens von Pauly-Inouye.<sup>2)</sup> Dasselbe beruht auf folgendem Prinzip: Sowohl Tyrosin wie Histidin geben mit Diazobenzolsulfosäure in alkalischer Lösung einen roten Farbstoff. Das Tyrosin wird nun durch die Einwirkung von Benzoylchlorid in der Weise verändert, daß die Kuppelung mit Diazobenzolsulfosäure ausbleibt. Beim freien Histidin ist dies nicht der Fall.

Für diese Prüfung wurden 0,05 g des aus *Pelamys* gewonnenen Protamins 6 Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht, die Salzsäure auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Bleioxyd erwärmt, nach dem Abkühlen mit Natriumcarbonat versetzt, filtriert und das Filtrat in zwei gleiche Teile geteilt.

Der eine Teil wurde mit 10 Tropfen Benzoylchlorid bis zum Verschwinden des Benzoylchlorids geschüttelt und sodann in sodaalkalischer Lösung mit Diazobenzolsulfosäure versetzt. Es entstand keine Rotfärbung, Histidin ist also nicht vorhanden. Der zweite Teil wurde ohne vorherige Einwirkung des Benzoyl-

<sup>1)</sup> Von der zoologischen Station in Neapel zugesandt.

<sup>2)</sup> Cf. Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 79 (1912).



chlorids mit Diazobenzolsulfosäure versetzt. In diesem Falle trat die Rotfärbung ein, wie nach dem positiven Ausfall der Millonschen Reaktion zu erwarten war.

*Xiphias gladius* (Schwertfisch).

(Mittelmeer.)<sup>1)</sup>

Aus den im August gesammelten Testikeln wurde ein dem Thynnin sehr ähnliches Protamin gewonnen. Das Verfahren war das von mir allgemein benutzte; eine schleimige Substanz, wie sie bei der Verarbeitung der Thunfischtestikel auftrat, war in diesem Falle nicht bemerkbar.

Das Protaminsulfat wurde als Öl abgeschieden, gab die Millonsche Reaktion und die Biuretreaktion. 0,1 g des Sulfats wurde zwei Tage mit kräftig wirkender Pepsinsalzsäure im Brütofen digeriert, ohne die Fällbarkeit durch Witte-Pepton zu verlieren. Die Hydrolyse wurde in bekannter Weise mit zwei Gramm des Protamins ausgeführt und ergab die folgenden Werte:

Prozente des Gesamtstickstoffs.

Ammoniakstickstoff	0
Histidinstickstoff	0
Argininstickstoff	81,5
Lysinstickstoff	0
Monoamidosäurestickstoff (gefunden)	14,0

Unter den Monoamidosäuren war Tyrosin nachweisbar.

*Oncorhynchus Tshawytscha* («Chinook»

oder «Quinnat salmon»).

(Sacramento river, Californien.)<sup>2)</sup>

Die chemischen Verhältnisse im Sperma dieses Salmo-

<sup>1)</sup> Von Herrn Dr. Sanzo in Messina übersandt.

<sup>2)</sup> Die hier mitgeteilten Untersuchungen wurden an dem vom Bureau of Fisheries in Washington übersandten Material ausgeführt. Außerdem wurde mir durch die Freundlichkeit des Herrn A. E. Taylor weiteres Ausgangsmaterial übermittelt.

niden sind von A. E. Taylor<sup>1)</sup> eingehend untersucht worden. Hierbei bediente sich Taylor zur Darstellung des Protamins und zur quantitativen Bestimmung des Arginins im wesentlichen derjenigen Methoden, welche ich früher bei anderen Salmoniden angewandt hatte, und gelangte zu Ergebnissen, welche mit den von mir beim Rheinlachs gewonnenen anscheinend übereinstimmen. Auch fand Taylor bei diesem Fisch dieselben Monoamidosäuren, welche Dakin und ich<sup>2)</sup> bei einer gemeinschaftlich ausgeführten Untersuchung des Salmins festgestellt hatten, nämlich Amidovaleriansäure, Serin und Prolin. Eine vollständige Vergleichung der von Taylor gefundenen Zahlen mit unseren früheren Analysen läßt sich leider nicht durchführen, da der Stickstoffgehalt des von Taylor aus *Oncorhynchus* gewonnenen Protamins nicht bekannt ist.

Ich habe das aus abgesondertem Sperma dieses Fisches erhaltene Protamin von neuem dargestellt und analysiert. Hierbei war in den Reaktionen keine Abweichung des *Oncorhynchus*-Protamins vom Lachs-Protamin bemerkbar, speziell sei erwähnt, daß das *Oncorhynchus*-Protamin durch Pepsinsalzsäure nicht angreifbar war. Nach einigen Untersuchungen, welche Herr Dr. Gawrilow im hiesigen Institut angestellt hat, ist auch die spezifische Drehung der beiden Protamine die gleiche.

Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurde lufttrockenes Protaminsulfat von bekanntem Stickstoffgehalt in Wasser gelöst. Man vermeidet auf diese Weise die Unsicherheit, welche durch die mehr oder minder weitgehende Austreibung des Hydratwassers beim Trocknen bedingt wird. Für die Vergleichung der verschiedenen Protamine genügt es, die spezifische Drehung statt auf das Gewicht des Protaminsulfats auf das Gewicht des im Protaminsulfat enthaltenen Stickstoffs zu berechnen. In diesen Fällen ergaben sich die in der folgenden Tabelle enthaltenen Werte:

<sup>1)</sup> A. E. Taylor, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 3, p. 389 (1908—1909).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 40, S. 311 und 565 (1903—1904); Bd. 41, S. 407 (1904).

Bezeichnung der untersuchten Substanz	Gewicht der in 1 ccm enthaltenen Substanz	l in dm	t	a	( $\alpha$ ) <sub>D</sub> für Stickstoff
Protaminsulfat aus Oncorhynchus	0,0494	2	38°	— 5,85	— 273
Dasselbe in 21% Schwefelsäure	0,0247	4	21°	— 6,00	— 280
Protaminsulfat aus Rheinlachs .	0,0521	2	39°	— 6,20	— 273
Dasselbe in 21% Schwefelsäure	0,0261	4	21°	— 6,52	— 287

Diese Zahlen lassen keinen für unsere Betrachtungen maßgebenden Unterschied im Drehungsvermögen der beiden Protamine erkennen.

Auch die bei der Hydrolyse für das Arginin erhaltenen Werte waren in beiden Fällen die gleichen. Das aus Onco-rhynchus gewonnene Salmin enthält 86,2% des gesamten Stickstoffs in Form von Arginin, während beim Salmin des Rheinlachs früher 87,8% gefunden worden ist. Die im Filtrat des Silberbarytniederschlags enthaltene Stickstoffmenge betrug 9,4% des Gesamten. A. E. Taylor führte in diesem Teil eine Bestimmung der verschiedenen Monoamidosäuren aus, deren Ergebnis aus der folgenden Zusammenstellung zu ersehen ist.

#### Gewichtsprozent des Salmins.

Salmin aus Oncorhynchus

Salmin aus Rheinlachs

(A. E. Taylor, 1908)

(A. Kossel und H. D. Dakin, 1904)

Arginin 91,73

87,4

Serin 8,70

7,8

Valin 5,35

4,3

Prolin 10,83

11,0

Außer den Formeln für das Salmin, welche A. Kossel und H. D. Dakin diskutiert haben,<sup>1)</sup> zieht Taylor noch eine andere in Betracht. Taylor nimmt nämlich eine Zusammensetzung aus 12 Mol. Arginin, 3 Mol. Serin, 1 Mol. Valin und 2 Mol. Prolin an. Unter der Voraussetzung, daß je zwei Bausteine des Salminmoleküls unter Austritt von H<sub>2</sub>O zusammentreten, würde sich hieraus die Formel C<sub>96</sub>H<sub>184</sub>N<sub>54</sub>O<sub>22</sub> ergeben und diese Formel wäre auch mit den Analysen von Goto<sup>2)</sup> in Übereinstimmung zu bringen. Hingegen zieht Taylor eine Formel vor, welche 10 Wasserstoffatome mehr und 10 Wassermoleküle weniger ent-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 414 (1904).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 94 (1902).



hält, und demgemäß ist auch der von ihm berechnete Wert für Arginin sehr hoch. Ich kann die von ihm S. 395 der zitierten Abhandlung diskutierte Formel  $C_{98}H_{174}N_{54}O_{12}$  nicht für hinreichend begründet halten. Für eine weitergehende Erörterung der Mengenverhältnisse, in welchen die Bausteine zusammengesetzt sind, ist das bis jetzt vorliegende Material immer noch nicht ausreichend.

*Coregonus albus* («whitefish».)  
(Nord-Amerika.)<sup>1)</sup>

Das abgelaichte Sperma wurde nach dem üblichen Verfahren mit siedendem Alkohol und sodann mit Äther extrahiert, die getrocknete Masse mit 1%iger Schwefelsäure ausgeschüttelt, die schwefelsaure Lösung mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in heißem Wasser gelöst. Auf die Reinigung durch Abscheidung des Sulfats als Öl verzichtete ich der geringen Substanzmenge halber, doch wurde die Fällung als Pikrat vorgenommen.

Die Hydrolyse lieferte folgende Werte:

Basenstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs.

Ammoniak	0
Histidin	0
Arginin	87,3
Lysin	0
Monoamidosäurestickstoff, gefunden	9,4

*Salvelinus* (Cristovomer) *Namaycush* («lake trout».)  
(Nord-Amerika.)<sup>1)</sup>

Das abgestrichene, mit siedendem Alkohol und Äther extrahierte Sperma wurde in der üblichen Weise mit verdünnter Schwefelsäure ausgeschüttelt, die schwefelsaure Lösung mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in möglichst wenig Wasser gelöst. Die Abscheidung des Öls aus dieser Lösung gelang auf Zusatz von Äther nur bei starker Abkühlung und in unvollkommener Weise. Ebenso wie das Sulfat war auch das Pikrat — oder wenigstens die Hauptmasse des Pikrats — leichter löslich, als dies bei den meisten Protaminen der Fall ist. Auf Zusatz von Natriumpikrat entstand in der wässrigen Lösung des als Öl abgeschiedenen Sulfats zunächst ein gut filtrierbarer Niederschlag (A), bei weiterem Zu-

<sup>1)</sup> Vom Bureau of Fisheries in Washington übersandt.

satz eine schleimige Fraktion, die nur durch großen Überschuß von Pikrinsäure ausgefällt werden konnte (B), ein dritter Teil (C) war auch durch großen Überschuß von Pikrinsäure nicht fällbar. Ebenso verhielt sich der leichter lösliche Teil des Sulfats, welcher nicht als Öl abgeschieden war. Derselbe ließ sich auch einen durch Natriumpikrat fällbaren (D) und einen nicht fällbaren Teil (E) trennen.

Die Fraktion A verhielt sich bezüglich der Löslichkeit und der Reaktionen dem Salmin ähnlich, sie ist im folgenden als «Salvelin» bezeichnet worden. Zum Vergleich wurden zwei der leichter löslichen Fraktionen vereinigt und ebenfalls analysiert. Diese Fraktionen enthielten einige Verunreinigungen, welche vermutlich als die Ursache der quantitativen Abweichungen anzusehen sind.

Basenstickstoff in Prozenten des Gesamtstickstoffs.

	Salvelin	Fraktion C + E
Ammoniak	0	0
Histidin	0	0 <sup>1)</sup>
Arginin	88,9	83,5
Lysin	0	0
Monoamidosaurestickstoff, gefunden	7,1	6,7

Nach den Bestimmungen des Herrn Dr. Gawrilow weicht das Salvelin in seinem Drehungsvermögen sehr bedeutend von allen bisher untersuchten Protaminen ab. Seine spezifische Drehung beträgt: für das lufttrockene Salvelinsulfat mit einem Stickstoffgehalt von 20,97% ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = -218,9. Hiernach würde ( $\alpha$ )<sub>D</sub> für den Salvelinstickstoff = -1045 sein.

#### Esox lucius (Hecht).

Der basische Proteinstoff aus den Spermien des Hechtes wurde zuerst<sup>2)</sup> von Herrn Dr. A. Hunter im hiesigen Labo-

<sup>1)</sup> Histidin war nicht nachweisbar, doch war in der Silberbarytfällung der Fraktion C + E eine organische Substanz enthalten, deren Silbersalz ähnliche Löslichkeitsverhältnisse zeigte wie Histidin. Der Stickstoffgehalt dieser Beimengung betrug 2,7% des Gesamtstickstoffs. Der Argininstickstoff ist nach Abzug dieser Verunreinigung berechnet worden.

<sup>2)</sup> Kurajeff erwähnt zwar (Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 197), daß er aus Hechttestikeln ein Protamin erhalten habe, macht indes keine Angaben, welche einen solchen Befund erweisen.

ratorium dargestellt und auf seine Reaktionen geprüft. Es ergab sich hieraus, daß ein Protamin vorlag, dessen Sulfat als Öl abgeschieden werden konnte. Dasselbe gab die Biuretreaktion und keine Rotfärbung mit Millons Reagens. Es wird von Pepsin nicht angegriffen und gehört offenbar der Salmingruppe an. Eine genauere Untersuchung war jedoch erst möglich, nachdem ich durch die Freundlichkeit des Herrn Professor Dr. Pauly in Würzburg eine etwas größere Menge des Ausgangsmaterials erhalten hatte.

Das Protamin, welches ich als Esocin bezeichne, wurde nach dem üblichen Verfahren dargestellt. Herr Dr. Gawrilow untersuchte die spezifische Drehung eines Präparates von Esocinsulfat, welches einen Stickstoffgehalt von 21,06 besaß, und fand  $(\alpha)_D = -68,9$ . Berechnet man diese Zahl auf den Stickstoff des Esocins, so erhält man  $(\alpha)_D = -327$ . Die spezifische Drehung ist etwas größer, als die des Salmins; ein sicheres Urteil über die Identität von Salmin und Esocin ist hiernach noch nicht abzugeben.

Zur Argininbestimmung wurden 5 g Esocinsulfat durch Kochen mit Schwefelsäure in bekannter Weise zerlegt. Es ergab sich folgendes:

Prozente des Gesamtstickstoffs.	
Ammoniakstickstoff	0
Histidinstickstoff	0
Argininstickstoff	86,3
Lysinstickstoff	0
Monoamidostickstoff, gefunden	11,3

Der Argininstickstoff stimmt mit dem der Salmingruppe überein.

### Allgemeine Ergebnisse.

Überblickt man die chemischen Verhältnisse, welche sich bei der Umformung der ursprünglichen Kernproteine zu den Protaminen in den Spermien der verschiedenen Fischspezies herausbilden, so bemerkt man, daß sich aus der Reihe der verschiedenartigen che-



mischen Entwicklungsprodukte gewisse Molekülgruppierungen herausheben, welche bei einer größeren Zahl der bisher untersuchten Protamine vorkommen. Das Gemeinsame dieser Bildungen besteht darin, daß bei ihnen auf je drei Bausteine zwei basische Äquivalente entfallen. Zum Beispiel bilden sich bei der Hydrolyse des Salmins annähernd auf zwei Moleküle Arginin je ein Molekül einer Monoamidosäure. Diese Eigentümlichkeit ist von mir und H. Pringle<sup>1)</sup> bereits früher für Salmin und Clupein hervorgehoben, meine neueren Untersuchungen zeigen, daß sie noch bei vielen anderen Protaminen vorkommt. Es ergibt sich dies aus der folgenden Zusammenstellung. Selbstverständlich bleibt infolge der Unvollkommenheit unserer Methodik eine gewisse Unsicherheit in der Berechnung der Zahlen, besonders bezüglich der Monoamidosäuren. So sind vielleicht die abweichenden Ergebnisse bei den Protaminen aus Salvelinus und aus Xiphias zu erklären.

### Molekularverhältnis des Arginins zu den gesamten Bausteinen der Protamine.

Herkunft des Protamins	Arginin	Gesamtzahl der Bausteine	Literaturnachweis
Salmo Salar . . . .	2	2,89	} A. Kossel und F. Kutscher, Diese Zeitschr., Bd. 31, S. 181; A. Kossel und H. D. Dakin, ebenda, Bd. 41, S. 143.
Salmo Salar . . . .	2	2,82	
Oncorhynchus Tschawyscha . . . .	2	2,8	
Coregonus albus . . .	2	2,86	
Clupea Harengus . . .	2	3,05	} Siehe A. Kossel und H. Pringle. Diese Zeitschr., Bd. 49, S. 302.
Scomber scomber . . .	2	2,96	
Thynnus thynnus . . .	2	3,1	
Esox lucius . . . . .	2	3,05	
Salvelinus Namaycush	2	2,64	
Xiphias gladius . . . .	2	3,4	

<sup>1)</sup> A. Kossel und H. Pringle, Diese Zeitschr., Bd. 49, S. 301 (1906).

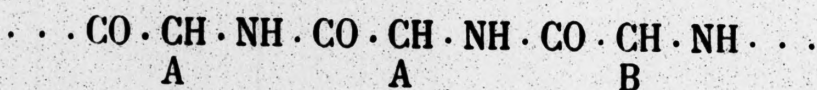
Bei der quantitativen Untersuchung der hydrolytischen Spaltungsprodukte wurde der Stickstoff des durch das Silberbarytverfahren oder durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Anteils als Monoamidosäurestickstoff in die Berechnung eingeführt. Die auf diese Weise erhaltenen Zahlen sind etwas zu niedrig, da ein Teil der stickstoffhaltigen Substanzen durch Nebenreaktionen verloren geht oder in den Niederschlägen stecken bleibt. Würde man die sämtlichen Verluste den Monoamidosäuren zurechnen, so würden diese etwas zu hoch ausfallen. Die letztere Berechnungsweise ist bei den kursiv gedruckten Zahlen des Clupeins und des Sturins (s. unten) angewandt worden. Beim Sturin (aus *Accipenser Sturio*) bedeutet also 2,72 einen Minimalwert, 3,28 einen Maximalwert.

Es ergibt sich also, daß zwei Drittel der Bausteine dieser Protamine aus Arginin bestehen. Dieser Befund ist um so mehr bemerkenswert, da auch bei anderen Protaminen, welche nicht der Salmingruppe zugehören und welche außer dem Arginin noch andere Basen enthalten, ein analoges Verhältnis gefunden wird. Auch im Percin und Sturin ist auf zwei basische Bausteine eine Monoamidosäure enthalten, wie aus der folgenden Zusammenstellung hervorgeht.

Herkunft des Protamins	Basische Gruppen	Gesamtbausteine
<i>Perca flavescens</i> . . . .	2	2,91
<i>Stizostedion vitreum</i> . .	2	3,01
<i>Accipenser Sturio</i> . . . .	2	2,72 (Minimalwert)
		3,28 (Maximalwert)

Dieses Zahlenverhältnis zwischen den basischen und nicht-basischen Bausteinen ist bei der Mehrzahl der Protamine vorhanden; es wird im Laufe der chemischen Differenzierung der Spermaproteine bei den verschiedenen Ordnungen und Unterklassen gewissermaßen als Endpunkt der Entwicklung erreicht. Daneben sind aber auch einige Protamine bekannt, bei deren Bildung dieser Endpunkt nicht erreicht wird, welche also reicher an Monoamidosäuren sind und in dieser Hinsicht den Histonen näher stehen: das Crenilabrin (aus *Crenilabrus Pavo*), das Cyclopterin (aus *Cyclopterus lumpus*) und die beiden Cyprinine (aus *Cyprinus carpio*).

Nach unseren früheren Erörterungen kann die bei der Mehrzahl der Protamine gefundene Gesetzmäßigkeit in der Zusammensetzung durch folgende Formel ausgedrückt werden:



wobei die Gruppe  $\underset{\text{A}}{\text{CO}} \cdot \text{CH} \cdot \text{NH}$ , peptidartig gebundenem Arginin, Histidin oder Lysin und die Gruppe  $\underset{\text{B}}{\text{CO}} \cdot \text{CH} \cdot \text{NH}$ , peptidartig gebundenen Monoamidosäuren entspricht.

Die folgende Tabelle soll eine Übersicht über die Verteilung der verschiedenen bisher bekannten Protamintypen in dem System der Fische geben.

Aus derselben ist das molekulare Verhältnis zwischen der Gesamtmenge der Basen und der Monoamidosäuren zu ersehen, und zwar ist das Arginin mit «a», das Histidin mit «h», das Lysin mit «l», die Summe der Monoamidosäuren mit «m» bezeichnet. Die Formel «a<sub>2</sub>m» soll ausdrücken, daß auf zwei Argininmoleküle je ein Molekül Monoamidosäure vorhanden ist, «(alh)<sub>2</sub>m» soll angeben, daß Arginin, Lysin und Histidin in dem Molekül enthalten sind und daß auf je zwei Moleküle von diesen Basen ein Molekül einer Monoamidosäure entfällt. Das Mengenverhältnis der Basen untereinander ist dabei nicht berücksichtigt.



