

Zur Histochemie der Spermatozoen.

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 30. April 1911.)

Unsere heutigen Anschauungen über die chemische Zusammensetzung der Zelle, und speziell des Zellkernes, beruhen im wesentlichen auf Untersuchungen, die an den Kernen von Leukocyten, an Kernen von Vogelblutkörperchen und besonders an den Köpfen von reifen Spermatozoen einiger Fischarten angestellt sind. Die Analysen am letztgenannten Objekt sind hauptsächlich von Miescher ausgeführt, der die Spermatozoen des Lachses eingehend untersucht hat. Seine Resultate sind nach seinem Tode von Schmiedeberg¹⁾ berechnet und herausgegeben, und nach ihm besteht der von der Intercellularflüssigkeit getrennte und vom Schwanze isolierte Kopf des reifen Spermatozoons des Lachses nach der Extraktion mit Alkohol und Äther im wesentlichen aus nucleinsaurem Protamin und zwar zu 60,50% aus Nucleinsäure und zu 35,56% aus Protamin = 96,06% neutralem nucleinsaurem Protamin.

Einen ähnlichen Wert (62,96%) für Nucleinsäure erhielt Mathews²⁾ bei der Untersuchung der Spermatozoen des Herings. Burian,³⁾ der die Zahlen Mieschers statt auf die ältere Nucleinsäureformel $C_{40}H_{54}N_{14}P_4O_{27}$ auf eine Formel $C_{40}H_{56}N_{14}P_4O_{26}$

¹⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXXVII, S. 118. — Miescher, Gesammelte Abhandlungen, Bd. II, S. 359.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 410.

³⁾ Ergebnisse der Physiologie, Bd. V, S. 806.

berechnet hat, findet statt der Schmiedeberg'schen Zahlen 59,83% Nucleinsäure und 35,32% Protamin.

Da nun seit den Untersuchungen Mieschers (seine letzten Arbeiten wurden von Schmiedeberg 1896 herausgegeben) sowohl unsere Kenntnisse über das Protamin wie über die Nucleinsäure sich wesentlich erweitert haben, so schien mir bei der Wichtigkeit dieser Untersuchungen für unsere gesamten Anschauungen über den Aufbau der Zelle eine erneute Inangriffnahme dieser Analysen geboten. Miescher hatte naturgemäß noch mit unvollkommenen Methoden bei der Isolierung der Nucleinsäure und des Protamins gearbeitet, sodaß seinen experimentell gefundenen Zahlen manche Mängel anhaften, während es doch notwendig erscheint, daß gerade in dieser wichtigen Frage wirklich einwandfreie Zahlen erhalten werden. So hat er z. B. niemals die Nucleinsäure als solche direkt bestimmt, sondern er hat die mit Alkohol und Äther erschöpften Spermatozoenköpfe in der Kälte mit Salzsäure extrahiert, um das Protamin zu entfernen. Durch solche Extraktion ließen sich aber nur 19,78% Protamin¹⁾ gewinnen und es mußte dabei sorgfältig darauf geachtet werden, daß die Salzsäure nicht etwa Nucleinsäure zersetzte und freie Phosphorsäure im Extrakt erschien. Deshalb konnte natürlich auch das Protamin nicht gründlich aus den Köpfen extrahiert werden, ein Teil blieb immer mit der Nucleinsäure vereint im Rückstand zurück (16,29% nach Schmiedeberg)²⁾ und die Menge der Nucleinsäure konnte nur indirekt aus dem Phosphorgehalt dieses Rückstandes berechnet werden. Hier mußte man aber notwendigerweise sämtlichen Phosphor des Ausgangsmaterials wiederfinden (es war sorgfältig vermieden worden, Phosphorsäure ins salzsaure Extrakt hineinzubekommen), und wenn man nun aus dem Phosphorgehalt des Rückstandes die Nucleinsäure berechnete, so war es nicht weiter auffällig, daß sämtlicher Phosphor in Form von Nucleinsäure wiedergefunden wurde.

Ich habe mich also bemüht, auf andere Weise die Frage zu lösen, und die Nucleinsäure aus den Spermatozoenköpfen

¹⁾ Miescher, Arbeiten, Bd. II, S. 398.

²⁾ Miescher, Arbeiten, Bd. II, S. 407.

nach der Methode von Neumann isoliert. War wirklich sämtlicher Phosphor in Form von Nucleinsäure vorhanden, so durfte jetzt im Filtrat der ausgefällten Nucleinsäure kein oder doch nur spurenhafte Phosphor gefunden werden.

Für den ersten Versuch, den ich in dieser Richtung unternommen habe, standen mir ca. 25 g reine Köpfe von reifen Heringsspermatozoen zur Verfügung. Das lebend frische Sperma war im März 1908 bezogen und so oft mit Wasser zentrifugiert worden, bis sich die Spermatozoenköpfe als weißes, schweres Pulver absetzten und die darüberstehende Waschflüssigkeit vollkommen farblos und klar war. Die Intercellularflüssigkeit und die Bestandteile der Schwänze waren auf diese Weise, wie die mikroskopische Kontrolle zeigte, vollständig entfernt, dagegen waren die Köpfe wohl erhalten und zeigten gegen Köpfe von unbehandelten Spermatozoen keinen Unterschied. Die noch etwa vorhandenen geringen Reste von den Bestandteilen der Schwänze wurden durch die darauffolgende erschöpfende Extraktion mit Alkohol und mit Äther mit Sicherheit entfernt. Dann war das Präparat, ein blendend weißes, schweres Pulver, in verschlossener Flasche aufbewahrt worden.

Die Resultate der zunächst ausgeführten Phosphor- und Stickstoffbestimmungen stimmten ziemlich gut überein mit den betreffenden Zahlen, die Miescher bei der Analyse der Spermatozoenköpfe des Lachses und Mathews bei der der Heringsspermatozoenköpfe gefunden haben.

Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt, für die Phosphorbestimmungen wurde hier und auch bei den folgenden Analysen dieser Untersuchung die Substanz nach Neumanns Methode mit Salpeterschwefelsäure verascht und nach seiner Vorschrift mit molybdänsaurem Ammoniak gefällt. Der Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammoniak wurde nun aber nicht nach der Auflösung in NaOH titriert, sondern in einer Lösung, die 2% Citronensäure und 2,5% Ammoniak enthielt, gelöst, die Flüssigkeit etwas erwärmt und mit einem geringen Überschuß von Magnesiamixtur gefällt. Der Niederschlag wurde, wie üblich, gewaschen, geglüht und gewogen und der Phosphor aus dem Magnesiumpyrophosphat berechnet.

So wurden folgende Werte erhalten. (Die Substanz war erst bei 90°, dann bei 110° und endlich bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Sie blieb dabei vollkommen weiß und verlor, wenn sie bei 90° gut vorgetrocknet war, nur sehr wenig an Gewicht bei den höheren Temperaturen.)

0,4276 g	sättigen ab 63,2 ccm	$n/10$ -Säure	=	20,71 % N	(Kjeldahl)
0,1012 »	»	» 15,0 »	»	=	20,77 % N
0,0999 »	»	» 14,9 »	»	=	20,87 % N
0,4599 g	geben	0,1028 g	$Mg_2P_2O_7$	=	6,22 % P
0,4859 »	»	0,1084 »	»	=	6,21 % P
0,4695 »	»	0,1051 »	»	=	6,23 % P
0,5208 »	»	0,1671 »	»	=	6,41 % P
0,1335 »	»	0,0325 »	»	=	6,78 % P
0,1601 »	»	0,0377 »	»	=	6,56 % P
0,1703 »	»	0,0398 »	»	=	6,51 % P

Im Mittel sind 20,78 % N und 6,42 % P erhalten worden.

Vergleicht man hiermit die Miescherschen Zahlen und diejenigen Mathews, so ergibt sich:

Miescher:

5,97 %, 5,96 %, 5,76 %, 5,67 %, 5,82 %: ¹⁾ Mittel 5,83 % P.
 5,46 %, 5,44 %, 5,48 %, 5,44 %, 5,34 %: ²⁾ Mittel 5,43 % P.
 21,03 % N, 20,73 % N. ²⁾

Mathews: ³⁾

6,33 %, 6,07 %, 6,02 %, 5,87 %: Mittel 6,07 % P.
 20,98 %, 20,86 %, 21,42 %, 21,44 %, 20,89 %, 20,78 %:
 Mittel 21,06 % N.

Die Stickstoffwerte stimmen sehr gut überein, etwas größer sind die Differenzen beim Phosphor; daß aber wirklich im Spermatozoonkopf des Lachses etwas weniger Phosphor vorhanden ist wie in dem des Herings, kann man den Analysen mit Sicherheit nicht entnehmen; wahrscheinlich ist die Differenz auf die Benutzung verschiedener Methoden zurückzuführen.

¹⁾ loc. cit., S. 395.

²⁾ loc. cit., S. 65.

³⁾ loc. cit., S. 408.

23 g der lufttrockenen Köpfe wurden in einem 500 ccm-Kolben mit 270 ccm Wasser, dem 20 g Natriumacetat zugesetzt waren, und 10 ccm 33%iger Natronlauge übergossen und ins siedende Wasser gestellt; da nach $\frac{1}{2}$ Stunde noch nicht alles in Lösung gegangen war, wurden noch 5 ccm 33%iger Natronlauge hinzugefügt und das Ganze 3 Stunden lang unter häufigem Schütteln im siedenden Wasserbade gehalten. Nach dieser Zeit war die Substanz bis auf Spuren in Lösung gegangen und die hellbernsteingelbe, leicht trübe Reaktionsflüssigkeit wurde über Nacht stehen gelassen. Da die Trübung auch am nächsten Morgen noch nicht verschwunden war, wurde sie abzentrifugiert und die nunmehr vollkommen klar gewordene Flüssigkeit auf 500 ccm aufgefüllt. (Die abzentrifugierte Trübung war größtenteils anorganisch und bestand aus Calciumphosphat.)

Von den 500 ccm wurden 2 mal je 10 ccm für P-Bestimmungen und 2 mal je 5 ccm für N-Bestimmungen genommen. In weiteren 10 ccm wurde mit Magnesiummischung kein Niederschlag erhalten, sodaß also noch keine anorganische Phosphorsäure in der Flüssigkeit vorhanden war.

Es gaben:

$$\begin{array}{l} 10 \text{ ccm } 0,0898 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \\ 10 \text{ » } 0,0899 \text{ » } \text{ » } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 10 \\ 10 \end{array}} \right\} = 0,0250 \text{ g P}$$

$$\begin{array}{l} 5 \text{ » } \text{sättigten } 29,5 \text{ ccm } n/10\text{-Säure} \\ 5 \text{ » } \text{ » } 29,5 \text{ » } \text{ » } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 5 \\ 5 \end{array}} \right\} = 0,0413 \text{ g N,}$$

sodaß also in 500 ccm 1,250 g P und 4,13 g N vorhanden waren. Aus dem Phosphorgehalt berechnen sich unter Zugrundelegung meiner Mittelzahl 19,5 g Köpfe, aus dem Stickstoffgehalt 19,9 g. Da die lufttrockenen Köpfe bei der Trocknung für die Analysen im Durchschnitt ca. 14% Wasser abgegeben hatten, so würden 23 g lufttrockene Substanz 19,8 g trockener entsprechen.

Nunmehr wurde die Reaktionsflüssigkeit mit ca. 25 ccm 50%iger Essigsäure ganz schwach angesäuert und, da kein Niederschlag hierbei entstand, wieder mit wenigen Tropfen Natriumcarbonat auf Lackmus schwach alkalisch gemacht und bis ca. 100 ccm auf schwach siedendem Wasserbade ein-

geengt. Nachdem jetzt die Flüssigkeit wieder schwach mit Essigsäure angesäuert war, wurde sie unter heftigem Rühren in 250 ccm 96%igen Alkohols gegossen und über Nacht stehen gelassen. Am anderen Morgen wurde der Niederschlag abzentrifugiert, in ca. 150 ccm heißem Wasser gelöst, mit wenigen Tropfen Essigsäure versetzt, da die Lösung wieder auf Lackmus alkalisch reagierte, und noch einmal in 96%igen Alkohol gegossen. Dieser neue Niederschlag wurde wieder in wenig heißem Wasser gelöst und die freie Nucleinsäure nunmehr durch Einrühren in salzsauren absoluten Alkohol ausgefällt. Es resultierte ein weißer Niederschlag, der mit Alkohol und Äther getrocknet wurde. Die Analyse dieses Niederschlages, der vakuumtrocken 11,92 g wog, ergab:

0,1381 g sättigten 14,3 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl) = 14,50% N
 0,1384 » » 14,2 » » = 14,40% »

0,1267 g gaben 0,0417 g $Mg_2P_2O_7$ = 9,16% P

0,1489 » » 0,0491 » » = 9,18% »

Die Substanz gab keine Biuretreaktion mehr.

Nach der von mir vorgeschlagenen Formel für die Nucleinsäure $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$ wären 8,94% P und 15,14% N verlangt, also 0,23% P zu viel und 0,69% N zu wenig gefunden, für die von Schmiedeberg¹⁾ berechneten Durchschnittswerte seiner Nucleinsäureanalysen sind 9,37% P und 15,17% N verlangt; danach wären 0,20% P zu wenig und 0,72% N zu wenig gefunden: also weder mit der einen noch der anderen Formel eine ganz exakte Übereinstimmung.

Unter Zugrundelegung meiner Zahlen für die Nucleinsäure müßten ferner 100 g Köpfe 71,81 g Nucleinsäure liefern; die in Arbeit genommenen 19,8 g Köpfe also 14,22 g. Demgegenüber sind 11,92 g in 460 ccm resp. in 500 ccm 12,95 g Nucleinsäure gefunden = 91% der theoretisch berechneten Menge, wenn man die gewogene Ausbeute in Rechnung setzt. 9% sind also nicht bestimmt oder müßten ins Filtrat gegangen sein.

Die Filtrate von der Nucleinsäurefällung aber wurden bei neutraler Reaktion eingeengt und auf 250 ccm aufgefüllt.

¹⁾ Arch. f. exp. Path., Bd. LVII, S. 328.

Dann gaben:

$$25 \text{ ccm } 0,0160 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,004454 \text{ g P}$$

$$25 \text{ » } 0,0156 \text{ » } \text{ » } = 0,004343 \text{ » }$$

im Mittel also in 250 ccm 0,04399 g P.

$$10 \text{ ccm sättigten } 52,3 \text{ ccm } \frac{n}{10}\text{-Säure} = 0,07322 \text{ g N}$$

$$5 \text{ » } \text{ » } 26,6 \text{ » } \text{ » } = 0,03724 \text{ » }$$

250 ccm enthielten also im Mittel 1,8112 g N.

Es waren also ins Filtrat nur ganz geringe Mengen Phosphor hineingegangen, die nach meiner Nucleinsäureformel 0,49 g Nucleinsäure entsprechen würden, von denen es aber nicht streng bewiesen ist, ob sie überhaupt Nucleinsäure gewesen sind. Als Kontrolle dafür, daß keine größeren Verluste stattgefunden haben, kann man die wiedergefundenen Phosphorwerte mit dem Ausgangswert vergleichen und findet dann: in 11,92 g Nucleinsäure mit 9,17% P 1,093 g P

+ im Filtrat der Nucleinsäure 0,004 »

1,097 g P in 460 ccm,

die verarbeitet wurden von einer Lösung, von der 500 ccm 1,250 g P enthielten, die also 1,150 g P entsprachen. Das gibt einen Verlust von 0,053 g P.

Dieselbe Berechnung für die Stickstoffwerte ergibt:

Im Nucleinsäureniederschlag mit 14,45% = 1,7225 g N

+ Im Filtrat = 1,8112 »

Wieder gefunden = 3,5337 g N

in 460 ccm mit 3,800 g N. Verlust = 0,266 g N.

Aus den bisherigen Zahlen kann man wohl, der Miescher'schen Theorie entsprechend, mit einiger Wahrscheinlichkeit schließen, daß der größte Teil des Phosphors in Form von Nucleinsäure in den Spermatozoenköpfen vorhanden ist — mit absoluter Schärfe ist dies aber durchaus nicht bewiesen und die Resultate verlangen energisch eine Wiederholung des ganzen Versuchs.

Vor allen Dingen müßte der Nucleinsäureniederschlag genauer analysiert werden und festgestellt werden, ob er unseren heutigen Anschauungen über die Nucleinsäuren auch wirklich entspricht. Ferner soll durch eine quantitative Be-

stimmung des Arginins die Menge des Clupeins im Spermatozoenkopf sichergestellt werden. Leider eignet sich für diese Bestimmung das Filtrat von der Nucleinsäuredarstellung in dem hier beschriebenen Versuche nicht, da durch die Wirkung des heißen Alkalis während der Nucleinsäuredarstellung schon ein Teil des Arginins in Ornithin¹⁾ verwandelt wird und über die Größe dieser Umwandlung keine genauen Angaben vorliegen. Ich besitze aber genügend Material, um die Argininbestimmung durch direkte Säurehydrolyse der Spermatozoenköpfe ausführen zu können und da nach den genauen Angaben Kossels 89% des Gesamt-N vom Clupein auf Arginin fallen, so wäre mit der Argininbestimmung auch die Bestimmung des Clupeins gegeben, vorausgesetzt natürlich, daß neben Clupein kein anderer Eiweißkörper im Spermatozoenkopf vorhanden ist.

Die Resultate dieser Untersuchung werde ich demnächst mitteilen.

¹⁾ Siehe dazu A. Kossel u. Fr. Weiss, Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 492, und Bd. LX, S. 311.