

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Zur Chemie des Zellkerns

von K. FELIX¹, Frankfurt

Eine Arbeitsrichtung in der physiologischen Chemie lehnt sich immer mehr an die Morphologie an und sucht zu ergründen, wie die einzelnen Gebilde, die man mit dem Mikroskop in der Zelle wahrnehmen kann, chemisch aufgebaut und welche Funktionen ihnen übertragen sind. Das grösste Interesse beansprucht der Kern, weil er für Leistung und Vermehrung der Zelle sowie für die Übertragung der Erbanlagen unentbehrlich ist. Die ersten Anhaltspunkte über seine Zusammensetzung gaben uns die alten Untersuchungen von MIESCHER² und HOPPE-SEYLER³ über die Kerne der Eiterkörperchen und der Fischspermatozoen.

In neuerer Zeit sind diese Untersuchungen wieder aufgenommen worden, weil inzwischen Methoden ausgearbeitet worden sind, welche die Kerne von der übrigen Zellmasse abtrennen.

Das erste Verfahren hat BEHRENS⁴ entwickelt. Er trocknet die Organe erst mit Azeton und Äther und pulvriert sie dann. Dieses Pulver wird in einer geeigneten Mischung organischer Lösungsmittel suspendiert, deren spezifisches Gewicht so gewählt werden muss, dass die Kerne zu Boden sinken, die anderen Partikelchen aber suspendiert bleiben.

Ein anderes Verfahren haben BENSLEY und HOER⁵ ausgearbeitet. Sie bedienen sich der Zentrifuge und trennen die Zellpartikelchen nach der Kraft, die nötig ist, sie auszuschleudern. Für die Kerne genügen bereits 10 min der 600fachen Erdbeschleunigung.

Die Kerne der Fischspermatozoen

Viel einfacher kann man die Kerne der Fischspermatozoen gewinnen, wenn man diese in destilliertem Wasser suspendiert⁶. Unter dem Phasenkontrastmikroskop ist dabei zu beobachten, wie der Zelleib quillt und sich schliesslich vom Kern ablöst. Für die Darstellung kann man dieses Ablösen beschleunigen, wenn man die Suspension ganz kurz homogenisiert.

Die folgenden Bilder zeigen einzelne Stadien der Plasmolyse. Sie sind von Herrn Dr. HUG vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt mit dem Elektronenmikroskop aufgenommen und auf das gleiche Mass vergrössert worden, etwa 9350fach.

Das erste Bild zeigt die Spermatozoen der Regenbogenforelle, das zweite dieselben Spermatozoen nach schräger Bedämpfung mit Chrom. Das dritte und vierte demonstrieren, wie der Plasmaleib quillt, die Fibrillen im Schwanz sich schlingen und beide sich vom Kern ablösen.

¹ Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt.

² F. MIESCHER, Hoppe-Seylers med.-chem. Untersuch. H. 4, 411 (1871); Verh. Basler naturforsch. Ges. 6, 138 (1874).

³ F. HOPPE-SEYLER, Med.-chem. Untersuch., H. 4, 486 (1871); Physiol. Chem., Berlin, 1. Aufl. (1881), S. 84.

⁴ M. BEHRENS, Z. physiol. Chem. 209, 59 (1932).

⁵ R. R. BENSLEY und N. HOER, Anat. Rev. 60, 449 (1934).

⁶ K. FELIX, H. FISCHER, A. KREKELS und R. MOHR, 1. Mitt. Zs. physiol. Chem. 287, 224 (1951); 2. Mitt. ebenda 289, 10 (1951); 3. Mitt. ebenda, 289, 127 (1952).

Für die präparative Darstellung geht man dann so weiter, dass man die homogenisierte Suspension zentrifugiert. Hierbei setzen sich die Kerne als reinweisses, lockeres Sediment ab. Die überstehende Flüssigkeit enthält sämtliche Bestandteile des Zytoplasmas. Zur weiteren Reinigung werden die Kerne noch mehrmals in destilliertem Wasser suspendiert, kurz homogenisiert und von neuem abzentrifugiert. Das Kernsediment haben wir meistens gleich weiter verarbeitet, einen Teil nur zur Analyse mit Azeton getrocknet.

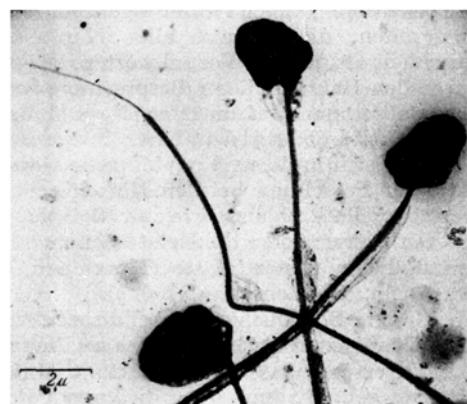


Abb. 1. Spermien der Regenbogenforelle. Übersichtsbild. Samenflüssigkeit mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, osmiumfixiert.

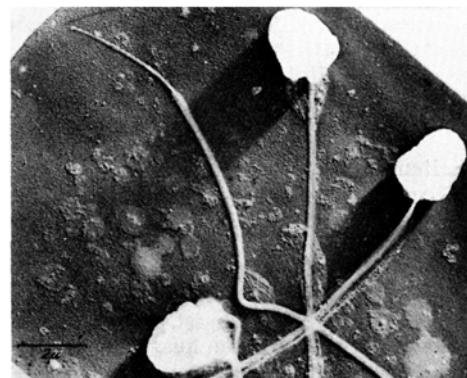


Abb. 2. Spermien der Regenbogenforelle. Übersichtsbild. Zweitaufnahme von Abb. 1 nach Chrombeschattung.

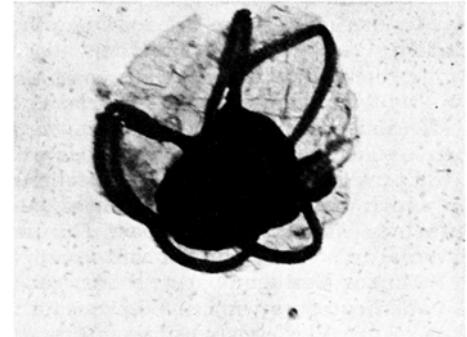


Abb. 3. Spermien 10 min in destilliertem H₂O, osmiumfixiert. 9350fach.

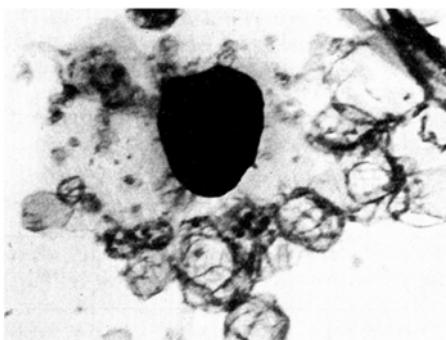


Abb. 4. Spermien 30 min in destilliertem H_2O , osmiumfixiert. 9350fach.

Im fünften Bild sind die isolierten Kerne zu sehen. Sie haben ihre Form, optische Dichte und Kontur nicht verändert; auch der Durchmesser ist der gleiche geblieben. Nur im letzten Bild ist der Rand leicht gewellt, das sind die getrockneten Kerne. Unter dem Einfluss des Azetons sind sie etwas geschrumpft. Die Kerne sind für die Aufnahmen mit Osmiumsäure fixiert worden. Ohne diese Behandlung schmelzen sie im Elektronenmikroskop, wobei sie etwas durchsichtiger werden, aber noch keine Struktur erkennen lassen.



Abb. 5 Spermienköpfe nach Plasmolyse, 30 min abzentrifugiert. 9350fach.

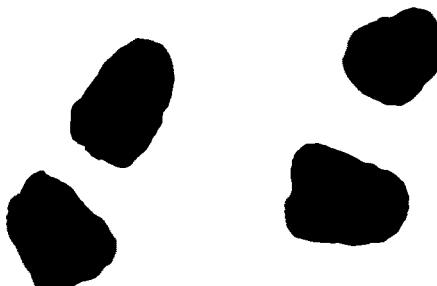


Abb. 6. Spermienköpfe mit Azeton getrocknet. 9350fach.

Auf die beschriebene Weise haben wir die Kerne aus den Spermatozoen der Regenbogen- und Bachforelle sowie des Saiblings dargestellt und in getrockneten Proben Stickstoff, Phosphor und Arginin bestimmt; ferner Farbenreaktionen auf einige Aminosäuren angestellt. Danach waren Zystin, Tyrosin und Tryptophan nicht vorhanden. Der Gehalt an Stickstoff, Phosphor und Arginin war bei allen drei Kernarten von der gleichen Größenordnung, wie die erste Tabelle zeigt. Das Verhältnis N:P wechselt innerhalb enger Grenzen; das von Phosphor zu Arginin ist durchweg fast wie 1:1.

1 Es ist nicht genau gleich 1, sondern immer etwas weniger Arginin vorhanden, das heißt, nicht jeder Phosphorsäurerest der Nukleinsäure ist durch Arginin neutralisiert. Der eine oder andere Phosphorsäurerest ist vielleicht durch die Aminosäure an den Aminoenden der Peptidketten (vorwiegend Prolin) neutralisiert. Einigen Phosphorsäureresten steht wahrscheinlich keine basische Gruppe des Protamins gegenüber. Im Clupein des Hering und wahrscheinlich auch in den anderen argininreichen Protaminen kommt die Kombination von 4 Argininresten nebeneinander häufig vor, aber dazwischen sind Dipeptide aus Monoaminoäuren geschaltet. Die diesen gegenüberstehenden Phosphorsäurereste werden nicht neutralisiert.

Tabelle I
Analyse der Kerne

	N	P	N:P	Arg	P:Arg
<i>Salmo irideus</i> , Regenbogenforelle .	19,67	5,87	3,35		
<i>Salmo fontinalis</i> Mitch., Saibling .	19,78	5,88	3,36	30,44	1:0,94
<i>Salmo trutta</i> , Bachforelle	19,80	5,72	3,46	30,42	1:0,947

MIRSKY und POLLISTER¹ haben als erste beobachtet, dass sich die Nukleoproteide der Kerne verschiedener Gewebe in 10% NaCl-Lösung auflösen. Die Kerne unserer Forellenspermatozoen gaben eine sehr viskose Lösung und hinterliessen keinen Rückstand.

Nukleoprotamine einziges Eiweiss der Spermatozoenkerne?

Gießt man diese Lösung der Kerne in destilliertes Wasser ein, dann fällt eine faserige Masse aus, die man leicht um den Glasstab wickeln und mit Wasser waschen kann. Mutterlauge und Waschwasser waren praktisch frei von Stickstoff und von organischer Trockensubstanz. Also ist das gesamte Kernmaterial in der Fasermasse wieder enthalten. Das beweisen auch die Analysen. Die Werte für Stickstoff, Phosphor und Arginin haben sich nicht geändert, auch die Verhältnisse Stickstoff zu Phosphor und Phosphor zu Arginin sind gleich geblieben.

Tabelle II
Analyse der Fasermasse

	N	P	N:P	Arg	P:Arg
Regenbogenforelle .	19,52	5,65	3,43	30,60	1:0,96
Saibling	19,67	5,73	3,43	30,15	1:0,94
Bachforelle	19,67	5,71	3,44	30,20	1:0,94

Aus den weiteren, später noch zu erörternden Analysen der Fasermassen geht hervor, dass sie ausschliesslich aus Protamin und Desoxyribonukleinsäure bestehen; das bedeutet, dass auch der Kern selbst als einziges Eiweiss nur Nukleoprotamin enthält. Eine Einschränkung muss allerdings eingeräumt werden; es könnte sein, dass bei der Plasmolyse ein wasserlösliches Protein herausdiffundiert ist. Wir haben aber dafür bis jetzt noch keine Anhaltspunkte gefunden. Lipoide, die in anderen Kernen regelmässig nachgewiesen wurden, scheinen im Spermatozoenkern nicht oder höchstens in ganz minimalen Spuren vorzukommen; denn das Azeton, mit dem wir die Kerne getrocknet haben, hinterliess beim Verdunsten nur einen minimalen Rückstand.

So schliessen wir aus unseren Befunden, dass der Spermatozoenkern nur aus Nukleoprotamin besteht. In einer Suspension von Kernen des Saiblings haben wir in aliquoten Teilen deren Anzahl und den P-Gehalt bestimmt und daraus den Gehalt eines einzelnen Kerns an Nukleinsäure ermittelt. Wir fanden $5,5 \cdot 10^{-6} \gamma$. Die

¹ A. E. MIRSKY und A. W. POLLISTER, Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 28, 344 (1942).

Zahl ist von der gleichen Größenordnung wie jene, zu denen die beiden VENDRELY¹ sowie MIRSKY und Ris² bei der Analyse der Kerne verschiedener tierischer Gewebe gekommen sind. Spermatozoen sollen allerdings nach den französischen Autoren nur $3,3 \cdot 10^{-6} \gamma$ enthalten, weil sie nur den halben Chromosomensatz besitzen. Das trifft auf die Fischspermatozoen, die wir untersucht haben, nicht zu. Aber man darf auf diese Zahlen kein grosses Gewicht legen, denn bei der Zählung der Kerne können zu leicht Fehler unterlaufen.

Chromosomin

Mit unserer Ansicht, dass die Spermatozoenkerne nur aus Nukleoprotamin bestehen, widersprechen wir verschiedenen Autoren.

Da sind zunächst einmal die beiden STEDMANS³, die annehmen, dass die Kerne aus drei Komponenten aufgebaut sind: Protamin, Nukleinsäure und Chromosomin. Letzteres soll ein Protein sein und etwa 10% der Kernmasse ausmachen. Sie kamen zu dieser Vermutung, weil in ihren Versuchen die Bilanz nicht aufging. Die Spermatozoenköpfe haben sie mit Zitronensäure oder verdünnter Essigsäure gefällt, aus dem Niederschlag das Protamin mit verdünnter Schwefelsäure und die Nukleinsäure mit verdünnter Natronlauge extrahiert. Der unlösliche Rest soll das Chromosomin sein, dessen reinste Präparate noch 8% Nukleinsäure enthielten. Nach unseren Versuchen handelt es sich dabei um nichts anderes als um ein denaturiertes Gemisch aus Protamin, Nukleinsäure und einem Eiweiss des Zytosplasmas, das durch die Zitronensäure oder die Essigsäure mit gefällt worden ist.

In unseren Arbeiten über das Clupein, das Protamin des Heringsspermas, haben wir nämlich ebenfalls die Köpfe von den Schwänzen durch Essigsäure getrennt⁴. In dem getrockneten Material, das wir vor dem Krieg gesammelt haben, kann man unter dem Phasenkontrastmikroskop erkennen, wie der Kern noch von einem schmalen Saum Zytosplasma umzogen ist. Es liegen also keine reinen Kerne vor. Darum geben sie auch noch die Reaktionen auf Zystin, Tyrosin und Tryptophan, Aminosäuren, die im Clupein nicht vorkommen. Wenn man aber die getrockneten, durch Essigsäure gefallten Spermatozoenköpfe mit 10% NaCl extrahiert und den filtrierten Extrakt in destilliertem Wasser eingesetzt, so bekommt man die gleiche Fasermasse wie aus dem Forellensperma, das auch ungefähr ebensoviel Stickstoff, Phosphor und Arginin enthält. Phosphor verhält sich zu Arginin wieder ungefähr wie 1:1, die Reaktionen auf jene anderen Aminosäuren sind negativ⁵.

Wenn man aber die trockenen Spermatozoenköpfe des Herings direkt erst mit Schwefelsäure und dann mit Natronlauge extrahiert, dann bleibt noch ein unlöslicher Rückstand, der etwa 4,5% Nukleinsäure und viel Arginin sowie Zystin, Tyrosin und Tryptophan enthält, also ungefähr dem Chromosomin der STEDMANS entspricht.

Nukleoprotamine von Salm und Stör

Zu demselben Resultat kamen wir, als wir getrocknete Spermatozoenköpfe des Salms und des Störs untersuchten,

die seinerzeit noch von KOSSEL dargestellt worden waren und die uns Prof. KUTSCHER freundlicherweise überlassen hatte. In der Tabelle III sind die Analysen der Kernfasermassen aus den Köpfen der Herings-, Salm- und Störsperratozoen zusammengestellt.

Tabelle III
Analysen der Kernfasermassen von Hering, Salm und Stör

	N	P	N:P	Arg	P:Arg
<i>Clupeus harengus</i> , Hering	19,57	5,68	3,44	30,77	1:0,96
<i>Salmo salar</i> , Salm	20,25	5,39	3,57	29,01	1:0,96
<i>Acipenser sturio</i> , Stör	19,72	5,47	3,60	23,51	1:0,76

Sie enthalten ungefähr gleichviel Stickstoff und Phosphor wie jene der Forellen. Das Verhältnis Stickstoff zu Phosphor ist auch von der gleichen Größenordnung. Im Nukleosalmin verhält sich Phosphor zu Arginin wieder wie 1:1. Im Nukleosturin, das neben Arginin noch Histidin und Lysin enthält, kommt dagegen auf ein Atom Phosphor bedeutend weniger als ein Molekül Arginin. Ein Teil der Phosphorsäurereste der Nukleinsäure wird durch die beiden anderen Hexonbasen neutralisiert.

Residualchromosom

Sehr viel schwerer wiegen aber die abweichenden Befunde von MIRSKY und Ris¹. Auch sie nehmen drei Bestandteile des Zellkerns an: Protamin oder Histon, Nukleinsäure und ein tryptophanhaltiges Protein. Sie haben ganze Gewebe, Salmerythrozyten und auch Salmespermatozoen mit NaCl-Lösung extrahiert, wobei ihnen ein unlöslicher Rest verblieb, der faserig war und zum grössten Teil aus einem tryptophanhaltigen Protein mit etwas Nukleinsäure bestand. MIRSKY sieht diesen Rest als Bestandteil der Chromosomen an und bezeichnet ihn als «Residualchromosom», ist aber vielleicht nicht immer von reinen Kernen ausgegangen. Es könnte diesen noch Eiweiss aus dem Zytosplasma beigemischt gewesen sein. Denn auch in unseren Versuchen mit den trockenen Köpfen der Heringsspermatozoen blieb jenes zystin-, tyrosin- und tryptophanhaltige Eiweiss im unlöslichen Rückstand.

Andere Zellkerne

Wie sich die Frage mit dem Residualchromosom zukünftig auch klären mag, eines ist unbedingt jetzt schon sicher: die Zellkerne der einzelnen Gewebe sind verschieden aufgebaut. Was am Spermatozoenkern gefunden worden ist, darf nicht ohne weiteres auf die Kerne anderer Gewebe und Zellen übertragen werden.

Bei jenen sind die Verhältnisse sehr viel günstiger. Der Spermatozoenkern liegt in einer Zelle, die nur wenig Zytosplasma enthält und nur kurze Zeit lebt. Die Zelle hat nur die eine Aufgabe, eine Eizelle zu befruchten und die väterlichen Merkmale auf die Nachkommen zu übertragen. Darauf ist sie spezialisiert.

Ganz anders ist die Situation bei einer Leber- oder einer Drüsenzelle, die beide viel mehr zu leisten haben. Jene ist zum Beispiel an der Synthese der Blutproteine beteiligt, diese an der Produktion eines fermentreichen

¹ R. VENDRELY und C. VENDRELY, 1st Internat. Congr. Biochem. Cambridge 1949; Exper. 4, 424 (1949).

² A. E. MIRSKY und H. RIS, Nature 163, 665 (1949).

³ E. und E. STEDMAN, Cold Spring Harbor Sympos. Quantitative Biol. 12, 224 (1947).

⁴ K. FELIX und A. MAGER, Z. physiol. Chem. 249, 11 (1937).

⁵ K. FELIX, H. FISCHER, A. KREKELS und R. MOHR, 1. Mitt. Z. physiol. Chem. 287, 224 (1951); 2. Mitt. ebenda 289, 10 (1951); 3. Mitt. ebenda, im Druck.

¹ A. E. MIRSKY und H. RIS, J. Gen. Physiol. 31, 1 (1947).

Sekretes. Die grössere Mannigfaltigkeit der Aufgaben, die einer Zelle übertragen sind, wirkt sich nicht nur auf das Zytoplasma, sondern auch auf den Zellkern aus. Man sieht das schon zum Beispiel darin, dass der Gehalt des einzelnen Kerns an Desoxyribonukleinsäure noch ungefähr so gross ist wie derjenige der anderen Zellen. Aber bezogen auf die Einheit der Kernmasse ist er bedeutend geringer geworden¹. Der Kern enthält mehr Eiweiss und andere Substanzen, wie zum Beispiel Lipoide, Fermente, freie Aminosäuren und sogar Vitamine², wobei es aber immer fraglich ist, ob das in den Kernen aufgefundene Material wirklich ein integrierender Bestandteil derselben ist oder ob es nur aus dem Zytoplasma herüberdiffundiert oder absorbiert ist.

Eines aber wird allgemein angenommen, nämlich dass zweierlei Nukleoproteide im Kern vorkommen; eines mit Desoxyribonukleinsäure und das andere mit Ribonukleinsäure als prosthetischer Gruppe. Das erste findet sich bei der Zellteilung in den Chromosomen wieder, das zweite soll nicht regelmässig vorhanden sein und nur im Kernkörperchen auftreten, das ebenfalls nicht immer in den Kernen nachzuweisen ist.

Wir vermuten heute, dass die Nukleinsäuren für die Eiweisssynthese notwendig sind³. Die Desoxyribonukleinsäure soll es nur mit dem Eiweiss der Chromosomen zu tun haben, die Ribonukleinsäure mit dem des Zytosplasmas und der Sekrete. Ribonukleoproteide treten nicht nur im Kern, sondern vorzugsweise im Zytoplasma auf. Offenbar wird das Eiweiss des Zytosplasmas nicht nur in diesem, sondern auch im Kern erzeugt. Im allgemeinen weisen nach den Versuchen mit radioaktivem Phosphor die Ribonukleoproteide einen viel lebhafteren Umsatz auf als die Desoxyribonukleoproteide⁴. Nur wenn es auf die Zellteilung zugeht, wenn also zum Beispiel viel Lebergewebe zu regenerieren ist, dann werden auch mehr Desoxyribonukleoproteide umgesetzt.

Das Eiweiss in diesen Nukleoproteiden ist noch nicht genau bekannt. Jedenfalls enthält es bedeutend mehr Aminosäuren als die Protamine. Eine Gruppe dieser Kerneiweisse gleicht aber noch den Protaminen durch ihren hohen Gehalt an basischen Aminosäuren. Es sind dies die Histone. Das erste Histon wurde aus den Kernen der roten Vogelblutkörperchen isoliert. Am besten untersucht ist das aus der Thymusdrüse. Nach den Ergebnissen von MIRSKY und Mitarbeitern⁵ scheint aber in allen Zellkernen tierischer Gewebe ein Histon vorzukommen. Einige Fischarten enthalten übrigens in ihren Spermatozoen ebenfalls Histone. Wahrscheinlich ist das Histon der Eiweisskörper, der mit der Desoxyribonukleinsäure salzartig verbunden ist. Somit dürfte das Nukleohiston das Eiweiss der Chromosomen, das heisst dem Nukleoprotamin homolog sein.

MIRSKY hat in einigen Histonen die Aminosäuren bestimmt. Es fällt auf, dass sie unabhängig von der Herkunft ziemlich gleichmässig zusammengesetzt sind. Allen fehlt das Tryptophan⁶.

Das zweite Nukleoproteid der Zellkerne mit der Ribonukleinsäure als prosthetischer Gruppe ist noch ganz unbekannt. Wahrscheinlich enthält es noch mehr Amino-

säuren als das Histon, unter ihnen vielleicht auch Tryptophan, aber die basischen Aminosäuren überwiegen nicht mehr. So kommt es, dass das Protein nicht nur salzartig, sondern noch irgendwie apolar an die Nukleinsäure gebunden ist. Diese Nukleoproteide lassen sich nicht durch verdünnte Säuren und Alkalien oder Kochsalz in die beiden Komponenten zerlegen.

Fermente des Spermatozoenkerns

Es sei noch einmal auf den Fermentgehalt der Kerne hingewiesen. In den meisten hat man, neben manchen anderen, eine Phosphatase aufgefunden. Sie fehlt aber in den Kernen der Forellen- und verwandten Spermatozoen. Die ganze Phosphataktivität derselben findet sich in der Zytosplasmafraktion und nicht in den Kernen.

Kerne von Saiblingsspermatozoen verzehrten im Warburgversuch keinen Sauerstoff.

Nukleoprotamin als Überträger der Erbanlagen

Wenn wir mit unserer Ansicht recht behalten sollten, dass der Kern der von uns untersuchten Fischspermatozoen nur aus Nukleoprotamin besteht, dann müsste dieses in seiner Zusammensetzung die Unterschiede zwischen den einzelnen Fischarten wiederspiegeln.

A priori könnten sich die Nukleoprotamine schon im Verhältnis von Nukleinsäure zu Protamin unterscheiden. Wir haben dasselbe bis jetzt nur bei dem Nukleoprotamin des Herings, dem Nukleoclupein, bestimmt bzw. aus dem Phosphor- und Arginingehalt sowie aus dem Gehalt an Desoxyribose berechnet. Es liegt bei etwa 60:40. Da auch in anderen Nukleoprotaminen auf ein Phosphor ein Arginin kommt, dürfte bei diesen das Verhältnis ungefähr das gleiche sein.

Weiter könnte die Nukleinsäure jeweils anders zusammengesetzt sein. Sie soll ja einen wesentlichen Anteil an der Genfunktion haben.

Die Desoxyribonukleinsäuren können sich durch den Gehalt an Purin- und Pyrimidinbasen unterscheiden, wahrscheinlich aber noch durch andere Momente, die wir zur Zeit nicht recht übersehen. Mit der Analyse der Nukleinsäure in den Spermatozoenkernen haben wir erst begonnen, Stickstoff und Phosphor bestimmt, und ungefähr bei allen ähnliche Werte gefunden. Im Ultraviolett absorbieren sie das Licht in der gleichen Weise wie alle anderen Nukleinsäuren vermöge des Gehaltes an Purin- und Pyrimidinbasen. Das Molekulargewicht der Nukleinsäure aus den Spermatozoen des Herings liegt nach der Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 800000.

Etwas mehr kann dagegen über die Protamine berichtet werden. Wir haben sie aus den Nukleoprotaminen mit verdünnter Salzsäure extrahiert, aus dem Extrakt die Protaminhydrochloride durch Azeton gefällt, wieder in wenig Wasser gelöst und im gefrorenen Zustand getrocknet. Sie enthalten alle ungefähr gleich viel Stickstoff, unterscheiden sich aber im Gehalt an Aminosäuren voneinander.

Glykokoll fehlt beim Hering, kommt aber in den fünf anderen Protaminen vor. Alanin und Serin fanden wir in allen, Prolin und Valin in fünf Protaminen, nicht aber im Sturin; Threonin nur im Clupein und im Sturin. Isoleuzin tritt in den Protaminen des Herings, der Regenbogen- und Seeforelle auf. Zweifellos ist diese Verteilung der Aminosäuren charakteristisch für die betreffenden Fischarten und reicht offenbar aus, um mit der Nukleinsäure zusammen die Erbfaktoren des Fischvaters auf die

¹ H. RIS und A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.* 33, 125 (1949).

² A. L. DOUNCE, G. H. TISHKOFF, S. R. BARNETT und R. M. FREER, *J. Gen. Physiol.* 33, 629 (1950).

³ R. M. CAMPBELL und H. W. KOSTERLITZ, *J. Physiol.* 106, 12 (1947). – J. N. DAVIDSON, *Cold Spring Harbor Sympos. Quantitative Biol.* 12, 50 (1947).

⁴ E. HAMMARSTEN und G. HEVESY, *Acta physiol. scandin.* 11, 335 (1946).

⁵ M. M. DALE, A. E. MIRSKY und H. RIS, *J. Gen. Physiol.* 34, 439 (1951).

⁶ B. DAIMLER, *Diss. Frankfurt a. M.* (1951).

Nachkommen zu übertragen. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, dass Saibling und Bachforelle sich miteinander kreuzen lassen, vielleicht deswegen, weil ihre Protamine so ähnlich zusammengesetzt sind. Man ist etwas enttäuscht, dass dem komplizierten Vorgang der Vererbung ein so einfaches Substrat zugrunde liegen soll. Wir wissen allerdings noch nicht, welchen Anteil die Nukleinsäure daran nimmt. Nach neueren Ansichten soll auch das Zytosol hier mitwirken.

Tabelle IV

Zusammensetzung verschiedener Protamine
(molekulares Verhältnis der Aminosäuren)

	Regenbogenforelle	Bachforelle	Saibling	Hering	Lachs	Stör
Glykokoll . . .	2	2	2	—	3	2
Serin	3	3	3	6	5	3
Alanin	2	2	2	4	2	5
Threonin	—	—	—	2	—	1
Valin	4	5	5	4	4	—
Prolin	5	5	5	5	5	—
Isoleuzin	1	—	—	1	—	2
Glutaminsäure . .	—	—	—	—	—	1
Arginin	50	50	50	53	55	35
Lysin	2	—	—	—	—	9
Histidin	—	—	—	—	—	7

Eine Frage dürfen wir wohl schon streifen, nämlich die, ob und wie in dem Nukleoprotamin die Chromosomen abgegrenzt und vorgebildet sind. Beantworten können wir sie gegenwärtig noch nicht, aber wenigstens das Nukleoprotamin auf seine Gliederung hin überprüfen. Eingangs erwähnte ich, dass der Kern wie ein homogenes Gel aussieht, das jedoch die Fähigkeit hat, in den faserigen Zustand überzugehen, und vielleicht wird von dieser Fähigkeit bei der Ausbildung der Chromosomen Gebrauch gemacht.

Diese Fähigkeit, Fasern zu bilden, verdankt das Nukleoprotamin zweifellos der Nukleinsäure und ihrem hohen Molekulargewicht.

Nachdem dieses ungefähr 800000 und der Anteil der Nukleinsäure am Nukleoprotamin etwa 60% beträgt, kommt letzterem ein Molekulargewicht von etwa $1,3 \cdot 10^6$ zu, und wenn unsere Zahl $5,5 \cdot 10^{-6} \gamma$ Nukleinsäure pro Kern nach Versuchen mit Saiblingsspermatozoen richtig ist, dann enthielte ein Kern etwa $4,5 \cdot 10^6$ Moleküle Nukleinsäure bzw. Nukleoprotamin; also genügend, um jedes Gen wenigstens mit einigen 1000 Molekülen auszustatten.

Da die Forellen 24 Chromosomen haben, kämen auf ein Chromosom etwa 190000 Moleküle Nukleoprotamin. Soweit ich orientiert bin, weiß man noch nicht, wieviel Erbanlagen bzw. Gene sie besitzen. Bei der *Drosophila* kennt man bis jetzt etwa 280, beim Menschen 1000. Nimmt man für die Forelle ebenfalls 1000 Gene an, dann trafen auf ein einzelnes etwa 4500 Moleküle Nukleoprotamin. Solche Rechnungen sind selbstverständlich noch verfrüht, können aber einen ungefähren Anhalt für die Größenordnungen geben. Bei 4500 Molekülen ist vom statistischen Standpunkt aus wahrscheinlich noch nicht garantiert, dass eine Reaktion in bestimmter Richtung abläuft, zum Beispiel ein Gen in das ihm zugeordnete Ferment umgewandelt wird. Um den Zufall

auszuschalten oder weitgehend einzuschränken, muss somit eine strukturelle Ordnung vorgesehen sein.

Die Gliederung des Protamins haben wir bis jetzt erst am Clupein untersuchen können, bei den anderen reichte das Material nicht aus. Nach den Ergebnissen der Elektrophorese und der Ultrazentrifuge ist selbst das schonest dargestellte Präparat ein Gemisch aus mehreren Komponenten, die sehr ähnlich zusammengesetzt sind und auf eine Monoaminoäure immer zwei Moleküle Arginin enthalten. Deswegen sind sie so schwer voneinander zu trennen. Ihr Molekulargewicht dürfte von 2000 bis 10000 wechseln und im groben Durchschnitt 5000 betragen. Mit einem Molekül Nukleinsäure wären somit rund 100 Moleküle Clupein verbunden.

In noch nicht veröffentlichten Versuchen haben RAUEN und STAMM das Clupein mit der Gegenstromverteilung fraktioniert und mehr als 10 Komponenten gefunden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es noch mehr sind, ja dass womöglich die Zahl der Chromosomen erreicht wird.

Die einzelnen Komponenten dürften sich nicht nur durch das Molekulargewicht, sondern noch durch den Gehalt an Monoaminoäuren unterscheiden. Die in geringer Konzentration vorhandenen, wie zum Beispiel das Isoleuzin und das Threonin, können nur in wenigen Komponenten auftreten. In dieser Hinsicht wäre eine gewisse Mannigfaltigkeit möglich, die der Chromosomenzahl gerecht würde; weitere Variationen ergeben sich aus der Anordnung der Aminosäuren in der Peptidkette. Nun sind die Protamine immer mit Nukleinsäure verbunden, und hieraus erwachsen wieder neue Möglichkeiten zur Vielfalt, je nachdem, welche Protaminkomponenten mit der Nukleinsäure verbunden und wie sie entlang ihrer Kette angeordnet sind. Jedem Gen eines Chromosoms könnte eine bestimmte Kombination entsprechen.

Eine Komponente mit einem Molekulargewicht von 4470 haben wir noch daraufhin untersucht, in welcher Ordnung die Aminosäuren in ihr aufgereiht sind. Am Aminoende steht ein Prolinrest und am Karboxylen Arginyl-arginin. Außerdem haben wir bereits vor dem Krieg das Clupein mit Säuren und Fermenten partiell hydrolysiert und die Spaltprodukte soweit wie möglich voneinander getrennt¹. Jetzt haben wir die Versuche wiederholt und die Ergebnisse etwas erweitert. Die wichtigsten bis jetzt isolierten Bruchstücke sind ein Dipeptid aus Monoaminoäuren, Alanyl-alanin, Arginyl-arginin, Alanyl-arginyl-arginin, Seryl-arginyl-arginin, Triarginyl-arginin.

Da etwa 34% des gesamten Clupeinstickstoffs in dem Tetrapeptid aus Arginin enthalten waren, muss diese Kombination von 4 Argininmolekülen häufiger vorkommen.

Auch die neuen Ergebnisse passen noch in die Formel, die wir für das Clupein aufgestellt hatten. Nach ihr beginnt die Kette mit einem Prolylrest (Prol), und dann wechseln regelmäßig 4 Arginin- mit 2 Monoaminoäureresten (M) miteinander ab, und die Kette endet mit 2 Argininresten [Prol-(Arg-Arg-Arg-Arg-M-M)_n-Arg-Arg].

Je nachdem, wo die Spaltung durchgeht, entstehen Tetrapeptide aus Arginin, Dipeptide aus Monoaminoäuren, Tripeptide aus einer Monoaminoäure und 2 Moleküle Arginin oder Arginyl-arginin.

Da die Forellenprotamine ebensoviel Arginin enthalten wie das Clupein, dürften auch hier Arginyl-arginin und Triarginyl-arginin vorkommen.

¹ K. FELIX und A. MAGER, Z. physiol. Chem. 249, 11 (1937).

Entstehung der Protamine

Aus den unreifen Testikeln kann man weder mit Säure ein Protamin noch mit Lauge eine Nukleinsäure extrahieren. Hier scheint die Nukleinsäure mit einem komplizierten Protein nicht dissoziabel verbunden zu sein. Dieses Protein dürfte zweifellos mehr, vielleicht sogar alle Aminosäuren enthalten. Wenn nun die Spermatozoen ausgebildet werden und heranreifen, dann wird dieses Eiweiss umgeformt, viele Aminosäuren verschwinden aus ihm, bis schliesslich eine Kombination übrigbleibt, die ausreicht, die Erbeigenschaften zu übertragen. Möglicherweise tritt auf einem Zwischenstadium der Umformung ein Histon auf.

Es verschwinden vor allem die für den Betrieb wichtigen Aminosäuren: Tryptophan, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Übrig bleiben mehr oder weniger «träge» Aminosäuren. Da nach Ansicht der Genetiker der Kern der Eizelle wahrscheinlich ebenso einfach gebaut ist wie der der Samenzelle, drängt sich die Frage auf, wie aus diesem einfachen Substrat, das nach der hier entwickelten Ansicht den Genen zugrunde liegen soll, die komplizierten Fermentproteine aufgebaut werden. Diese enthalten sehr viele Aminosäuren, vor allem Tyrosin, das überhaupt keinem wirksamen Eiweiss fehlt. Das Material, mit dem die Gene zum Ferment ergänzt werden, befindet sich im Zytosoma der Eizelle; wäre an sich auch im Zytosoma der Samenzelle enthalten. Aber letzteres scheint für die Befruchtung und Entwicklung nicht nötig zu sein. Denn es gelang uns, Saiblingseier mit isolierten und gründlich gewaschenen Saiblingskernen künstlich zu befruchten¹. Sie haben sich wie natürlich befruchtete entwickelt, und die jungen Fischlein unterschieden sich weder in der Gestalt noch in der Farbe noch in der Mutterkeit von den anderen. Wenn wir den Vorgängen nachgehen, wie eine Aminosäure nach der anderen aus dem Zytosoma ein Gen zu einem Ferment ergänzt, bietet sich uns eine neue Gelegenheit, etwas von dem Wirken jenes unbekannten Prinzips zu erfahren, das die Lebensvorgänge ordnet.

Summary

The nuclei of spermatozoa from several species of trout, herring, sturgeon and salmon consist of nucleoprotamines only.

The ratio of phosphorus to arginine almost reaches 1:1 in nucleoprotamine of trout, salmon and herring. Some of the phosphoric acid residues in nucleo-sturine are neutralized by other basic amino acids.

The nucleic acid of the nuclei is exclusively of the deoxyribose type. Ribonucleic acid occurs in cytoplasm of the sperm only.

The molecular weight of nucleoprotamine is about 1.3×10^6 . One single nucleus of a certain trout species (Saibling) consists of 4.5×10^6 nucleoprotamine molecules as roughly calculated.

Eggs of a trout species have been artificially fertilized, and from those eggs young fish could be raised which behaved and looked normally.

¹ K. FELIX, J. HARTLEIB und A. KREKELS, Z. physiol. Chem. (im Druck).

STUDIORUM PROGRESSUS**Electrophoretic Studies of Milk**

Investigations on centrifuged milk of dairy cows

By G. V. HEYNDRICKX and A. DE VLEESCHAUWER¹, Ghent

Introduction. — The results of the electrophoretic investigations on colostrum, which appeared in the first publication of this series², showed the presence of eight fractions (A to H) in the milk. In view of the results obtained, we ascribed a casein character to the B and G components and a globulin character to the H component. It was not possible to determine the specific nature of the other protein fractions (A, C, D, E and F) and the place of the albumin peak or peaks in the electrophoresis diagrams. The object of this investigation was to obtain additional information on these problems.

Methods. — By high-speed centrifuging of milk, various portions of the casein are separated out, according to their content in the milk and the applied centrifugal force. Using this principle, three tests were carried out, two on normal milk and one on colostrum. Before dialysis the milk was centrifuged at 7 000; 25 000 and 38 000 \times gravity respectively. The milk as well as the sera prepared in this way were dialysed as usual against MICHAELIS veronal-sodium buffer³ of pH 8 and ionic strength 0.1. Electrophoresis was carried out at 2°C with a current strength of 25 mA. For this purpose we used the Strübin apparatus⁴, described in detail in the numerous publications of WIEDEMANN⁵. In addition to the electrophoresis tests, the casein content on normal milk samples was determined, while complete chemical fractionation was carried out on the colostrum sample, according to the method of ROWLAND⁶, but with the difference that the albumin was calculated from the difference between the total proteins and the casein plus globulin.

Experimental results and discussion

The results of the electrophoretic examination show in the first place that the quickly-moving component A (only 1-2% of the total diagram), which was also found in the former investigation, is identical with the η -component found by MOORE and LYNN⁷, and is consequently not to be considered as a normal part of the diagram. At any rate, this does not modify the conclusions drawn from the former investigation. To avoid any confusion, the designations of the different components (A-H) have not been changed, though the component A was not included in the relative percentages.

In Table I the results of the chemical fractionation are shown, and in Table II those of the electrophoretic examination of the two normal milk samples.

¹ State Agricultural University, Coupure 233, Ghent (Belgium).

² G. V. HEYNDRICKX and A. DE VLEESCHAUWER, Bioch. Biophys. acta 6, 487 (1951).

³ L. MICHAELIS, Biochem. Z. 234, 139 (1931).

⁴ Messrs. Strübin & Co., Gerbergasse, Basle (Switzerland).

⁵ E. WIEDEMANN, Helv. chim. acta 30, 639, 648 (1947); 31, 40, 2037 (1948); Chimia 2, 25 (1948); Exper. 3, 341 (1947); Rev. Hématol. 3, 251 (1948); Sci. Pharm. 17, 45 (1949).

⁶ S. J. ROWLAND, J. Dairy Research 9, 30 (1938).

⁷ DAN H. MOORE and JOHN LYNN, J. Biol. Chem. 141, 819 (1941).