

SCIENCE IN TRANSLATION

ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF PUS CELLS

Medicinisch-Chemische Untersuchungen 4 (1871)

Translation: Kersten Hall & Neeraja Sankaran

© The Author(s) 2020



To foster understanding of the history and social impact of science, technology and medicine in all their branches in the academic and the wider communities, and to provide a national focus for the discipline.

Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen¹

Von Dr. F. Miescher aus Basel.

Die Chemie des Eiters ist bis vor Kurzem fast nur von den Gesichtspunkten ausstudiert worden, die für die Untersuchung von pathologischen Transsudaten massgebend waren. In neuerer Zeit hat man sich mit der Erforschung der Eigenschaften des Protoplasma auch an die Eiterzellen gewandt. Insbesondere musste sich aber seit den bekannten Untersuchungen über die Herkunft der Eiterzellen der Gedanke aufdrängen, dass hier das nächstliegende Material sei zum Studium dieser Zellenspezies, die als constante Grösse nunmehr an so vielen Orten wird eingeführt werden müssen; ein Material, nicht tadelfrei, mit Vorsicht zu verwerthen, aber das einzige leicht zu beschaffende und deshalb zum vorläufigen Ausgangspunkt geeignet.

In diesem Sinne habe ich versucht, über die eigentlich gewebsbildenden Stoffe in den Eiterzellen zu einiger Orientierung zu gelangen. Die ganze Reihe der Extractivstoffe, in sofern sie ihrer Menge und Beschaffenheit nach nicht als wesentliche Gewebsbildner zu betrachten sind, habe ich bei Seite gelassen. Das Material zur Untersuchung wurde mir durch dankenswerthe Vermittlung der Herren Assistenzärzte Dr. Bever und Dr. Koch aus der Tübinger chirurgischen Klinik geliefert. Die Verbände, weitaus überwiegend von Operationswunden herrührend, wurden gesammelt, täglich auf das Laboratorium [p. 442] gesandt und sofort frisch in Arbeit genommen. Was durch Geruch und Aussehen sich als in weitergehender Zersetzung begriffen zeigte, wurde verworfen. Wo es wesentlich darauf ankam, geschah noch eine besondere Auslese durch mikroskopische Controle; es wurden in diesen Fällen auch diejenigen Portionen verworfen, welche sauer reagierten. Der Zufall hat mich während der Zeit meiner Untersuchung nicht gerade begünstigt. Niemals habe ich grössere Mengen von gutem Abscesseiter erhalten, wie für eine eingehende qualitative Untersuchung erforderlich gewesen wäre. Die mir zu Gebote stehenden Mengen waren sehr wechselnd, selten bis zu ein paar Unzen, oft minim. Indess hat der Eiter aus gut granulierenden Operationswunden den Vorzug, dass er verhältnissmässig frisch gebildet ist, nicht lange vorher im Organismus stagnirt hat.

Dass ich es hier nicht mehr mit physiologisch frischen, d. h. lebenden Eiterzellen zu thun hatte, versteht sich von selbst. Für diese werden meine Resultate einer Correction durch besondere Beobachtungen bedürfen. Dem

¹ Die Untersuchungen, welche Hr. Miescher in dieser Abhandlung schildert, sind im Tübinger Schlosslaboratorium von Herbst 1868 bis Herbst 1869 ausgeführt und mir kurz darauf zur Veröffentlichung in diesem Hefte übergeben, dessen Erscheinen durch mehre unvorhergesehene Umstände sehr verzögert ist.

On the chemical composition of pus cells¹

By Dr. F. Miescher from Basel.

The chemistry of pus has, until recently, been studied almost exclusively for its importance in investigations of pathological transudates.^a More recently, investigations into the properties of the protoplasm have also turned to pus cells. Based particularly on the well known studies on the origins of pus cells, it occurs to one that they are a readily available source of material produced consistently and in many different locations in the body. Although not free from impurities, this material, if prepared carefully, is the only one that can be obtained with ease and therefore seems suitable as a preliminary starting point for such studies.

With this objective in mind, I have attempted to obtain some indications about the actual tissue-forming constituents of pus cells. Insofar as they are not considered to be essential tissue-formers in terms of their quantity and composition, I will not be discussing the entirety of the extracted constituents of pus. The material for examination was kindly provided by Dr. Bever and Dr. Koch, assistant clinicians at the Tübingen surgical clinic. The bandages were obtained predominantly from surgical wound dressings and were collected daily, sent to the laboratory and used immediately, while still fresh. Any material showing signs of ongoing degradation on the basis of appearance and aroma was discarded. When deemed necessary, the specimens were examined under the microscope and those found to be acidic were discarded. Luck has hardly favoured me during the course of my investigations. At no time did I have at my disposal a large amount of pus derived from abscesses, which would have been essential for a detailed qualitative investigation. The quantities made available to me were highly variable and rarely amounted to even a couple of ounces. Nevertheless, pus obtained from well granulated surgical wounds has the advantage of being relatively freshly formed and not having stagnated for long in the body.^b

Needless to say, I will have nothing further to say here about physiologically fresh, living pus cells. For such insights to be possible, my results would require verification through specific observations. If, within the narrow confines of

¹ The investigations, which are described by Mr. Miescher in this paper were carried out in the Tübingen laboratory from autumn 1868 to autumn 1869 and shortly thereafter handed over to me for publication in this booklet, the appearance of which has been severely delayed due to several unforeseen circumstances.

im Ganzen ungenügenden Zufluss an Material, sowie dem durch äussere Umstände herbeigeführten Abschluss ist es zum Theil zuzuschreiben, wenn auch innerhalb der gesteckten engeren Aufgabe meine Darstellung nicht vollständig ist.

Das erste Desiderat bei dieser Untersuchung ist die Trennung der Zellen vom Serum. Die Filtration liefert zwar oft etwas klares Serum, doch ist es wohl immer nur ein Theil des Vorhandenen. Die Senkung mittelst Kochsalzlösungen, die man für die Blutkörperchen mit gutem Erfolge angewandt, lässt hier im Stich, da die ganze Masse dabei bekanntlich schleimig verquillt, und zwar bei den verschiedensten Concentrationen. Ich habe mich deshalb nach andern Salzlösungen umgesehen. Nachdem ich eine ganze Reihe von Salzen der Alkalien und alkalischen Erden geprüft, bin ich schliesslich stehen geblieben bei einer Mischung von einem Theil kalt gesättigter Glaubersalzlösung mit 9 Theilen Wasser. Mit dieser Lösung, welche in klar filtrirtem Eiterserum keine Trübung hervorbringt, wurden die Verbände, welche den Eiter in Watte imbibirt enthielten, ausgewaschen. Ans der zur Entfernung von Baumwollfäserchen durch Leinwand geseihten Flüssigkeit setzten sich die Zellen grösstentheils so rasch ab, dass meist nach ein oder zwei Stunden eine trübe Flüssigkeit von einem breiigen Bodensatz abgossen werden konnte. Die Auswaschung konnte meist im Laufe eines Tages zwei bis drei Mal wiederholt werden. Dabei war die Senkung bei den späteren Aufgüssen viel vollständiger, die abgossene Flüssigkeit nur noch wenig trübe. Von dem Brei der Eiterkörperchen lässt sich durch Filtration der grösste Theil der Waschflüssigkeit entfernen. Die so erhaltenen Zellen erwiesen sich unter dem Mikroskop als sphärisch, leicht gequollen, eher opak als blass, bei gutem Eiter ohne eine Spur von Zerfall. Die von Rovida beschriebene Abgrenzung einer opaken körnigen Portion von einer hyalinen quellenden Masse war an vielen Zellen in ihren geringeren Graden besonders deutlich. Diese mässige Quellung mag die Ursache sein, dass, namentlich bei sehr frischem Eiter, bei den späteren Auswaschungen, wenn die Salzlösung etwas lange eingewirkt hatte, zu einem Klumpen zusammenbackten. Die Auswaschung hat aber noch einen weiteren Vortheil. Mancher, der Beschaffenheit der Zellen nach guter Eiter, wie z. B. Knocheneiter, enthält merkliche Mengen von freiem Fett beigemischt. Dieses bleibt beim Auswaschen grösstentheils suspendirt, ebenso der Detritus aus schon zerfallenen Zellen, und der Bodensatz ist, wenn auch nicht vollständig, davon befreit. Sehr fettreicher Eiter setzt sich schlecht oder gar nicht ab. Ausser der genannten Glaubersalzlösung habe ich für gewisse Zwecke, z. B. für die Aufsuchung der Alkalien in der Asche, eine auf die Hälfte verdünnte, gesättigte Lösung von salpetersaurem Baryt verwandt, ein Salz, das sich

my task, my account appears to be incomplete, the gap may be ascribed to the entirely inadequate supply of material as well as outside circumstances.

The first task in this investigation was the separation of the cells from serum. The filtration yielded a somewhat clear serum, although it represents only a fraction of the total amount. Sedimentation with saline solution, which has been used successfully for blood corpuscles, fails in this case, because, as it is well known, the whole mass becomes a slimy mess at different concentrations of table salt. I therefore looked around for other kinds of salt solutions. Having tested a whole range of salts of the alkalis and alkaline-earth metals, I finally settled on using a mixture of one part cold saturated sodium sulphate solution to nine parts water, which produces no turbidity when mixed with clear, filtered pus serum. The bandages containing the pus in cotton wool, were washed with this solution. After the removal of cotton wool fibres by filtration through linen, the cells settled so quickly that after one or two hours a cloudy liquid could be decanted from a paste-like sediment. These washings could be repeated two or three times over the course of a day. As a result, the extraction/separation in these later washes was much more complete, and the decanted liquid only slightly cloudy. Most of the fluid from the washings can be removed from the slurry of pus cells by filtration. Under the microscope, the cells thus obtained appeared spherical, slightly swollen, opaque rather than pale, and, in good pus samples, free from any traces of decomposition. The distinction, described by Rovida,^c between an opaque, granular portion and a hyaline swollen mass was,^d in many cells of reduced quality, especially significant. This moderate swelling is the reason why, in later washings of very fresh pus, by which time the salt solution has had some time to take effect, pus cells aggregate together into clumps. The washing has, however, yet another advantage. In many instances, the composition of cells obtained from good pus, such as in bone, contains appreciable quantities of free fat admixed. During the washing the sediment remains mostly if not completely free of both fat and the already decomposed cells, which remain largely in suspension. Very fat-rich pus does not sediment well, if at all. In addition to the aforementioned sodium sulphate solution, I have for certain purposes, such as the detection of alkali in ash, used a 50:50 dilution of a saturated solution of potassium nitrate and barium sulphate—which has already been proven effective by others for blood cells. This solution, which sediments the blood cells quite well, results in turbidity when added to pus serum, however. When the procedure was carried out quite quickly, after the third wash, the decanted and filtered liquid, gave only minimal precipitation

schon in den Händen anderer Beobachter für die Blutkörperchen bewährt hat. Die Lösung senkt die Zellen ziemlich gut, bewirkt aber in Eiterserum eine Trübung. Die nach der dritten Auswaschung (je mit den 5-10 fachen Volumen des Eiterzellenbreies) abgessene und filtrirte Waschflüssigkeit gab, wenn recht rasch verfahren wurde, beim Kochen und Ansäuern nur wenige Flocken von Eiweiss. Eintröpfeln in viel Wasser brachte durchaus keine Trübung hervor, ausser zuweilen bei Anwendung von salpetersaurem Baryt, der die Zellen etwas mehr anzugreifen scheint. Wesentliche Mengen von Eiweissstoffen waren also nicht gelöst.

1. Die Eiweisskörper des Protoplasma.

Dass Eiweisskörper die überwiegende Masse der Zellsubstanz bilden, ergibt sich einfach daraus, dass die mit Alkohol und Wasser ausgekochten Zellen (ca 60° des Ganzen) sich wie ein coagulirter Albuminstoff verhalten, der durch concentrirte Salzsäure oder kaustische Alkalien die bekannten Umwandlungen in Syntonin resp. Kalialbuminat erleidet. Doch ein kleiner Theil des beim Verdünnen der salzsauern Lösung herausfallenden Niederschlags löst sich in viel Wasser nicht wieder auf. Wir werden sehen, dass derselbe wahrscheinlich den Kernsubstanzen entspricht. Analog verhält sich das Neutralisationspräzipitat aus der alkalischen Lösung. - Wie bei den Albuminstoffen gehen neben der genannten Umwandlung und auf dieselbe folgend, noch weitergehende Veränderungen vor sich. Die nähere Classifizierung der [p. 444] in den Zellen enthaltenen Eiweissstoffe ist bis jetzt offenbar durch mangelhafte Isolirung der Zellen sehr erschwert worden, da gerade im Eiterserum selbst eine ganze Anzahl von Eiweisskörpern nachgewiesen sind. Daher manigfache Divergenz der Autoren.

Eine längst bekannte Eigenthümlichkeit des Eiters ist sein Verhalten zu Kochsalzlösungen von 3-10 % und darüber. Es bildet sich unter Zerstörung der Zellen eine schleimige trübe Gallerte, welche durch Wasser gefällt wird und „on den Einen (Hoppe-Seyler)¹ mit Myosin, von Andern (Horst, Heynsius) mit Fibrin, das ja in Salzen auch quillt, verglichen worden ist. Rovidá hat das mikroskopische Bild,² welches diese Quellung der Zellen in ihren ersten Stadien darbietet, genauer verfolgt und ist nach Beobachtungen an Eiter, Speichelkörperchen und farblosen Blutkörperchen zu dem Ergebniss gelangt, dass zwei Bestandtheile des Protoplasma scharf zu unterscheiden sind. Meine Beobachtungen an isolirten Eiterzellen haben insoweit seine Beobachtungen bestätigt. Schon nach 24stündiger Einwirkung der zum Auswaschen benützten Glaubersalzlösung zeigten viele Zellen einen hyalinen Saum, zuweilen rings um die übrige Substanz, öfter einseitig, häufig halbkugelige Vorrangungen und Fortsätze bildend. Die körnige, stark lichtbrechende

¹ Handbuch der physiologisch-chemischen Analyse pag. 863.

² Sitzungsbericht der Wiener Akademie Bd. 56 u. a. a. 0.

of protein following boiling and acidification. The drop by drop addition of a large volume of water caused no turbidity, except occasionally when using nitric barite,^c which appeared to attack the cell further. Substantial amounts of protein were also not dissolved.

1. The Proteins of the Protoplasm

That the predominant mass of the cell is made of protein is shown by the simple fact that cells heated with alcohol and water behave like a coagulated albuminous substance which, when treated with hydrochloric acid or caustic alkalis undergoes the familiar transformation into syntonin.¹ But on diluting the hydrochloric acid solution, a small part of the resulting precipitate does not redissolve in excess water. We will see that the latter probably corresponds to the nuclear material. The precipitate resulting from neutralisation with an alkaline solution behaves in a similar way. As with albuminous substances, further changes take place during the aforementioned and subsequent conversions. Apparently, the detailed classification of cellular proteins has been made difficult by the inadequate isolation of cells, especially in pus serum, in which a whole range of proteins have been detected. Hence the diverging opinions of so many authors.

A long recognised quality of pus is its behaviour in saline solutions of 3-10% concentration and above. Upon disruption of the cells, it [pus] forms a slimy, turbid gel which absorbs water and which some (Hoppe-Seyler)¹ have compared with myosin, and others (Horst, Heynsius) with fibrin as these proteins also swell up in salt solution. Rovidá has followed the microscopic picture which is represented by this swelling of the cells in their first stages more closely,² and, after observations of pus, salivary bodies, and white blood-corpules, has concluded that protoplasm contains two constituents which are to be sharply distinguished. My observations on isolated pus cells have so far confirmed his observations. After 24 hours of exposure to the Glauber's salt solution used for washing out, many cells already showed a transparent border, sometimes around the remaining substance, often on one side, often forming hemispherical protrusions and appendages. The granular, strongly refractive portion appeared as the central mass, almost as a round or oval

¹ Handbook of physiological chemical analysis, p.363.

² Proceedings of the Vienna Academy Bd. 56 u. a. a. O

Portion erschien bald als centrale Masse, bald wie ein rundliches oder ovales Anhängsel oder als halbmondförmiger Saum um die hyaline Substanz. Die Kerne waren meist, doch nicht immer, im körnigen Theil enthalten. Weitergehende Stadien habe ich dann bei mehrtägiger ClNa einwirkung gesehen. Die hyalinen Portionen nahmen an Volumen mehr und mehr zu, ihre anfangs sehr deutliche Contour wurde blässer und verschwand endlich ganz. Die körnigen Reste behielten ihre Form und Lichtbrechung; manche blieben noch lange compact, das Bild geschrumpfter intacter Zellen vortäuschend; manche zerfielen bald in Krümeln, zwischen denen nackte, etwas gequollene Kerne sichtbar waren. In wiefern diese Körper bei lebenden Zellen vorgebildet sind, ihnen etwa gesonderte Rolle zukomme, darüber konnte ich auf Grund meiner Beobachtungen an todtten Gebilden mir kein Urtheil erlauben.

Die als Endproduct dieser Einwirkung erhaltene schleimige Masse vertheilt sich niemals gleichmässig in überschüssiger ClNa lösung; auch nach noch so oft wiederholtem Schütteln ballt sie sich immer wieder in schleimige Klumpen zusammen. Durch Wasser wird die Gallerte in Fetzen gefällt. Man erkennt zwischen den körnigen unverändert gebliebenen [p. 445] Zellresten eine faserig membranöse Masse, welche in reichlicher Menge die Zellreste zusammenkittet, - offenbar nichts anderes als die vorher gequollene Substanz. Dieses Bild ist auch nach tagelanger Einwirkung von viel destillirtem Wasser unverändert. Die hyaline Substanz kann also unmöglich, wie Rovida behauptet, in Wasser löslich sein. Die gefällten Fetzen und Flocken gaben mit Salzlösungen wieder die vorige Gallerte. Hatte destillirtes Wasser auf dieselben oder auch unmittelbar auf die frisch isolirten Zellen, mehr als 24-36 Stunden eingewirkt, so trat jedoch die Quellung nach ClNazusatz nicht mehr ein. In sehr verdünnter Salzsäure oder Sodalösung löste sich die amorphe Substanz zwischen den Zellresten auf, und diese körnigen Residuen blieben frei in der Flüssigkeit suspendirt.

Ich habe mich nun oft vergeblich bemüht, durch Filtration aus der ClNa gallerle eine Lösung zu erhalten, welche Myosinreactionen gäbe. Es lief fast immer eine ziemliche Menge Flüssigkeit durch, dieselbe gab aber, in Wasser getropft, keine Trübung, höchstens in seltenen Fällen eine geringe Spur, die man immer noch einer unvollständigen Auswaschung des Serum zuschreiben könnte. Auf dem Filter blieb der desto zähere Schleimklumpen zurück. Es handelt sich also durchaus nur um eine Quellung, nicht um eine wirkliche Lösung. Auf einem andern Wege noch habe ich die Darstellung des Myosins oder ähnlicher Körper versucht. Aus Muskeln lässt sich mit sehr verdünnten Lösungen von Na_2CO_3 ($\frac{1}{2}$ -1%) Myosin in sehr beträchtlicher Menge extrahiren und ist durch genaue Neutralisation mit Essigsäure ausgefällt, in ClNa wieder löslich zur opalisirenden Flüssigkeit. Auch aus Eiterzellen erhielt ich nach

attachment or a semi-circular margin around the transparent substance. The nuclei were mostly, but not always, contained in the granular portion. I also observed further stages of change in the material after exposure to sodium chloride for several more days. The hyaline portions increased more and more in volume until their initially well-defined contours became paler and finally disappeared completely. The remaining granular bodies retained their form and refractivity; some remained compact for a long time, taking on the appearance of shrunken intact cells; some soon disintegrated into fragments in which bare, somewhat swollen nuclei could be seen. Based on my observations of dead structures, I was unable to judge the extent to which these bodies are found in living cells and what their particular functions might be.

The slimy mass obtained as the end product of this procedure is never uniformly distributed in an excess of saline solution; even after repeated shaking it still always aggregates into slimy clumps. The jelly can be broken up with water. Between the remains of the granular cells, which are unchanged, one recognises a fibrous membranous mass which binds together cellular debris - apparently the same thing as the previously described swollen substance. This mass remains unchanged even after the daily addition of large amounts of distilled water. [Therefore], the hyaline substance cannot possibly be soluble in water, as Rovida claims. When treated with saline solution, the deposited fragments and flakes reverted to their former jelly-like state. If the freshly isolated cells had been treated with distilled water for more than 24-36 hours then the addition of sodium chloride did not cause them to swell again. The amorphous substance between the remains of the cell dissolves in very dilute hydrochloric acid or sodium bicarbonate solution, and the granular residues remain freely suspended in the liquid.

I have often tried in vain to obtain a filtrate of the the sodium chloride jelly which reacts like myosin. Although there was almost always quite a large amount of liquid flowing through, it showed no turbidity when added dropwise to water. At most, in rare cases, these drops contained slight traces [of myosin-like material] which could always be ascribed to incomplete washing of the serum. The more viscous lumps of slime remained on the filter. It therefore behaved only as a swelling and not as a true solution.⁵ In a different line of investigation, I attempted the preparation of myosin and similar substances [from pus]. Using very dilute solutions of sodium carbonate, myosin can be extracted in considerable quantities from muscle and precipitated by exact neutralisation with acetic acid, before being redissolved in sodium chloride to form an opalescent liquid. After treating pus cells for the same duration with

gleich langer Behandlung mit derselben schwach alkalischen Flüssigkeit sehr wesentliche Mengen von Stoffen in Lösung; aber der durch Neutralisation entstandene Niederschlag war in Salzen weder quellbar noch löslich; eine 10% ClNaLösung, mit relativ grossen Mengen dieses Niederschlages behandelt und dann filtrirt, hatte nicht die Eigenschaft erhalten, mit viel Wasser sich zu trüben. Es ist bekannt, dass in sehr verdünnter (1/1000) ClH das Myosin sehr leicht löslich ist und sich dann allmählig in Syntonin umwandelt. Neutralisirt man sehr bald, so erhält man noch viel unverändertes Myosin (Hoppe, Anleitung zur physiolog. ehern. Analyse). Aber auch so kam ich nicht zum Ziele. Freilich konnte ich mit den etwas träge filtrirenden Flüssigkeiten nicht in wenigen Minuten zu Ende kommen, wie es wünschbar gewesen wäre.

Es ist mir also nach all diesem nicht gelungen, von der in ClNa quellenden, sogenannten hyalinen Substanz (Rovida) der Eiterzellen eine unveränderte filtrirbare Lösung zu erhalten. Ich glaube desshalb, dass [p. 446] man sie nicht als eigentliches Myosin bezeichnen darf. Bemerkenswerth ist aber immerhin die bekannte Thatsache, dass ruan aus den Eiterzellen mit sehr verdünnter Salzsäure ‚erhältnissmässig rasch grosse Mengen von Eiweisskörpern extrahiren kann; gerade für die myosinähnlichen Körper, die sogenannten Globuline nach Hoppe's neuester Eintheilung ist die leichte Löslichkeit in dieser verdünnten Säure bezeichnend.

Die in 1/1000 ClH schwer löslichen, in ClNa unverändert bleibenden Protoplasmareste bestehen Mch der Unlöslichkeit in kochendem Wasser, Alkohol und Aether, nach der Löslichkeit in Verdauungsflüssigkeit ohne Zweifel gleichfalls aus einem Eiweisskörper. Eine sehr verdünnte Sodalösung (0,05-0,2 ‰) macht sie blass, quillt sie etwas, und scheint sie etwas, wenn auch langsam und unvollständig, zu lösen. Denn, wie schon oben berichtet, erhält man aus dieser Lösung durch Neutralisation einen reichlichen flockigen Niederschlag, der in ClNa unlöslich ist. Ein Theil desselben löst sich aber auch schwierig im Ueberschuss von Essigsäure und in verdünnter ClH auf, im Gegensatz zu dem gewöhnlichen Albuminat, mit dem er sonst Aehnlichkeit haben mag. Ein Rest von dem Niederschlag bleibt unter allen diesen Umständen ungelöst. Im Ganzen stimmt also meine Auffassung mit derjenigen von Rovida ziemlich überein, mit Ausnahme des Umstandes, dass der in ClNa quellende Stoff in Wasser löslich sein soll. Rovida schliesst diess aus der Aufblähung und dem Platzen der Zellen bei Wasserzusatz. Dieses schon von Förster beobachtete Phänomen lässt sich aber gewiss hinreichend erklären durch das primäre Entstehen einer wenig elastischen Fällungsmembran und den nachfolgenden endosmodischen Austausch zwischen Wasser und salzhaltigem Protoplasma; die Zelle schwillt auf und die Membran zerreisst.

the same weak alkaline solution, I found very significant amounts of material in solution; but the precipitate that resulted from neutralisation was neither soluble nor capable of swelling in salt solution. When a relatively large amount of this precipitate was treated with a 10% saline solution and then filtered, it did not become cloudy in excess water. It is well known that myosin is readily soluble in highly dilute (1 part in 1000) hydrochloric acid, where it gradually transforms into syntonin. If neutralised quickly enough, one still finds a large amount of unaltered myosin (Hoppe, Anleitung zur physiologischen und chemischen Analyse). But I did not achieve this result [with my material]. Admittedly I could not reach the end point with a matter of minutes as I had hoped, because of the sluggish rate of filtration.

Even after all this treatment, I have not succeeded in obtaining an unaltered filtrable solution from the so-called hyaline substance (Rovida) of pus cells, swollen in saline solution. I therefore believe that one cannot call this substance actual myosin. Nevertheless the well known fact that, using a proportionate amount of highly dilute hydrochloric acid, one can quickly obtain a large amount of proteins from pus cells, is striking. Similarly, the myosin-like bodies, which according to Hoppe's latest classification are known as globulins, are distinguished by their ready solubility in these dilute acids.

Due to their insolubility in water, alcohol and ether, and their solubility in digestive juices, these remnants of protoplasm which are highly soluble in 1/1000 hydrochloric acid and unaltered in sodium chloride are, without doubt composed of protein. A very weak solution of sodium carbonate (0.05-0.2%) makes them pale, causes them to swell somewhat and causes them to dissolve, albeit slowly and incompletely. Then, as has already been mentioned, by neutralising this solution, one obtains a rich particulate precipitate which is insoluble in sodium chloride. A portion of this precipitate is soluble in excess acetic acid and in weak hydrochloric acid, in contrast to the common albumin to which it is otherwise very similar. The rest of the precipitate remains insoluble under all circumstances. So with the exception of his notion that the material which swells in saline should be soluble in water, I am in complete agreement with Rovida. He arrived at his conclusion based on his observation of the swelling and the bursting of the cells when water is added. This phenomenon, already observed by Förster, can be sufficiently explained by the appearance of a minimally elastic membrane across which the resulting osmotic exchange between water and salty protoplasm causes the cell to swell and the membrane to burst.

Indess geht eine nicht unwesentliche Menge von Eiweissstoffen auch aus gut ausgewaschenen Zellen in Lösung über. Eine Bestimmung, die mit einem kleinen Verlust auf Seite des unlöslichen Theils behaftet ist, weil die wässrige Lösung sich nicht absolut klar absetzte, ergab:

mit Wasser erschöpfter Rückstand, bei 100° getrocknet	0,5930 gr.
durch Kochen und A aus der wässrigen Lösung coagulirt	0,0635 gr.
Total	0,6565 gr.

Wenn es noch eines Beweises bedürfte, dass die quellende Substanz, die gewiss einen sehr bedeutenden Bruchtheil des Protoplasma ausmacht, in Wasser nicht oder höchstens spuren weise löslich sein kann, so würde diess schon darauf hinweisen.

In der wässrigen Lösung waren nun drei verschiedene Eiweisskörper zu unterscheiden. [p. 447]

1) Alkalialbuminat, durch Kohlensäure theilweise, durch A besser gefällt, in ClNa unlöslich, in ClH 1/1000 löslich. Ob es in phosphorsaurem Alkali gelöst sei, was ich nicht für unwahrscheinlich halte, habe ich wegen grosser Verdünnung der Lösungen noch nicht entscheiden können.

2) Ein bei 48-49° coagulirender Eiweissstoff. Die ausgeschiedenen Flocken sind unlöslich in. ClH 1/1000, in ClNa, sowie in sehr verdünnter Sodalösung, sind folglich nicht etwa bloss in phosphorsanrem Salz gelöstes Albuminat.

3) Ein Eiweissstoff, der bei der gewöhnlichen Temperatur des Serumeiweisses coagulirt.

Rechnen wir nun noch hinzu

4) den in Wasser unlöslichen, in ClNa quellenden, in ClH 1/1000 löslichen Eiweissstoff, Rovida's hyaline Substanz.

5) den in Wasser und in ClNa unveränderten, in ClH 1/1000 schwer löslichen Eiweissstoff;

so haben wir 5 verschiedene Eiweisskörper. Bekanntlich sind im Muskel nach Kühne's Darstellung ebenfalls mindestens 5 verschiedene Eiweissstoffe zu unterscheiden.

- 1) Alkalialbuminat.
- 2) Bei 49° (beim Säugethier) coagulirender Körper.
- 3) Serumeiweiss.
- 4) Myosin, in Cl Na und Cl H dilut. löslich.
- 5) Substanz der Fleischprismen.

Es wäre der Mühe werth, dieser Analogie näher nachzuprüfen, was die

But, a not insignificant amount of protein in solution, also comes from cells that have been well washed. An assay, of the aqueous solution which was [slightly cloudy] due to the retention of traces of the insoluble portion gave [the following results]:

Dehydrated residue- dried at 100°C	0.5930 grammes.
Through boiling and coagulation with ether from the aqueous solution	0.0635 grammes.
Total	0.6565 grammes.

If proof was still needed that the swollen substance constitutes a significant fraction of the protoplasm and is either insoluble or only slightly soluble in water, this is it.

In the aqueous solution, three different proteins could be distinguished:

1) Alkaline albumin, partially carbonated, better precipitated with ether, insoluble in sodium chloride, soluble in 1/1000 hydrochloric acid.ⁱ Due to the excessive dilution of the solution, I was unable to determine whether it is soluble in alkaline phosphoric acid, which I don't think is improbable.

2) A protein that coagulated at 48-49°C. The resulting particles are insoluble in 1/1000 hydrochloric acid, in sodium chloride, as well as in weak sodium carbonate solution and are therefore not just albuminate dissolved in a phosphoric salt.

3) A protein that coagulates at the same temperature at which serum proteins normally do.

To this list let us now add

4) Rovida's hyaline substance, which is insoluble in water, swells in sodium chloride, and soluble in 1/1000 hydrochloric acid.

5) A poorly soluble protein that is unchanged in water and sodium chloride and highly soluble in 1/1000 hydrochloric acid.

So we have five different proteins. As is well known, in Kühne's account there are at least five different types of protein in muscle.^j

- 1) Alkaline albumin
- 2) A particle that coagulates at 49°C (in mammals)
- 3) Serum protein
- 4) Myosin, which is soluble in sodium chloride and dilute hydrochloric acid.
- 5) Muscle fibre components.

It would be worthwhile to trace these similarities further, but time did not

Zeit mir nicht mehr erlaubte. - Identität aber ist sicherlich nicht vorhanden.

Ich kann natürlich nicht leugnen, dass vielleicht noch geringe Mengen anderweitiger Eiweissstoffe, vielleicht leichter diffundirende, durch Waschflüssigkeit extrahirt sein können; jedenfalls werden es nur Spuren sein. Man wird sich wundern, unter den angeführten Stoffen das sogenannte Paraglobulin zu vermissen. Ich kann die Möglichkeit nicht ganz abstreiten, dass ein derartiger Körper in geringer Menge vorhanden sei; aber ich weiss wirklich nicht, wie ich ihn hätte nachweisen sollen, denn durch Kohlensäure oder sehr wenig A erhielt ich aus den neutralen oder schwach alcalisch gemachten wässrigen Lösungen die schon oben erwähnten, in C1Na unlöslichen Trübungen und Niederschläge. Dadurch etwa verdecktes Paraglobulin konnte indess schwerlich mehr als eine Spur sein. Hinsichtlich des Myosins habe ich mich schon ausgesprochen. Ich habe nie mehr als einige Tropfen Eiterserum untersuchen können und bin daher nicht im Stande gewesen, die Ei-[p. 448]weisskörper derselben näher zu prüfen. Wenn wirklich ächtes Myosin sich im Eiterserum findet, sowie Paraglobulin oder Fibrinogen in wesentlich grösserer Menge als sonst in Serum und in Transsudaten, so mag man immerhin triftige Gründe haben, anzunehmen, dass sie aus den Zellen stammen. Aber nach den erhaltenen Resultaten muss ich festhalten, dass sie, in erheblicher Menge gefunden, nur das Resultat einer Veränderung der ursprünglichen Zellenbestandtheile sein können, vielleicht derjenigen chemischen Vorgänge, welche den Zerfall und die schliessliche Auflösung ausgelebter Zellen begleiten, anderer zahlreicher Möglichkeiten nicht zu gedenken, unter denen zu entscheiden der Mangel an Thatsachen mir verbietet.

2. Das Alkoholextract.

Digerirt man die Zellen mehrere Mal längere Zeit mit starkem Alkohol bei 50- 60°, so gebt eine sehr bedeutende Quantität von Bestandtheilen in Lösung über. Hat man nicht sehr vollständig abgegossen, ist der Alkohol nicht sehr stark, hat man versäumt, einige Tropfen Essigsäure zuzusetzen, so gehen leicht ziemlich grosse Mengen eiweissartiger Stoffe in die Lösung und fallen beim Erkalten aus, wohl ein Beweis, dass das Alkali (oder alcalisch reagirende Salze, (z. B, phosphorsaures Kali?) bei der Bindung der Eiweissstoffe eine Rolle spielt. Ist diess vermieden worden, so erhält man eine bei gewöhnlicher Temperatur fast farblose Lösung, aus der beim Erkalten undeutlich krystallinische Flocken und ölige Tröpfchen in mässiger Menge sich abscheiden. Ein grosser, vielleicht der grössere Theil der Substanzen bleibt gelöst. Verdunstet man das gesammte Extract bei mässiger Temperatur zur Trockne, so erhält man eine halb ölige, halb undurchsichtige visköse Masse, welche an der Luft ziemlich stark Wasser anzieht. Aether löst allmählig,

allow it. But whether they are identical is by no means certain.

Of course, I cannot deny that there may yet be small amounts of other proteins that are perhaps easily lost in the successive washings during the extraction process; in any case there would only be traces. One may be surprised when reading the listed substances to see that paraglobulin is missing. I cannot wholly rule out the possibility that this substance is present in very small amounts but I do not know how I could prove it, because, when using carbonic acid or a small amount of ether, I obtained from the aforementioned neutral or weakly alkaline aqueous solution, a turbidity and sediment insoluble in sodium chloride. Paraglobulin could hardly be present in more than a mere trace. I have already commented on the myosins. I have never been able to examine more than a few drops of pus serum and therefore have not been able to examine the proteins present in pus more closely. If pure myosin could actually be found in the pus serum, as well as paraglobulin or fibrinogen in significantly larger amounts than usual in serum and transudates, then one would have good reason to conclude that they originated from the pus cells. From the results obtained, I am forced to conclude that when found in significant amounts, these substances can only be the result of an alteration in the original constituents of the pus cells. Perhaps they form as a result of those chemical processes that accompany the decomposition and final dissolution of exhausted cells. Or they may be due to any number of other reasons about which I withhold comment due to an absence of facts.

2. The Alcohol Extract

If the cells are incubated for a much longer period with strong alcohol at 50-60°, then a significant amount of the constituents go into solution. If the alcohol has not been completely decanted, if it is not very strong; if the addition of a few drops of acetic acid has been omitted, then fairly large quantities of albuminous substances easily enter the solution and precipitate on cooling, probably evidence that the alkali (or alkaline-reacting salts, for example potash salts dissolved in phosphoric acid?) plays a role in binding the protein. If we can prevent this [dissolution and re-precipitation], then we obtain a solution that is almost colourless at room temperature, and which, upon cooling, yields deposits of indistinct crystalline flakes and oily droplets. A larger, perhaps even the largest, portion of the substances remains dissolved. If the whole extract is desiccated by evaporation at a moderate temperatures, then a semi-opaque, semi-oily viscous mass that readily absorbs water from the air is obtained. Ether appears to dissolve the greater portion of this mass,

wie es scheint, den überwiegenden Theil davon auf und es bleibt ein mehr flockig krümliger Rückstand. Das quantitative Verhältniss des Extracts zum erschöpften Rückstande ergab sich in zwei Versuchen folgendermassen. Für 100 Theile trockener (SO_4Na_2 frei berechneter) Eiterkörperchen:

Rückstand, bei 100° getrocknet.	Extract, im Vacuum getrocknet.
I. 59,2 %	40,8 %
II. 60,2 %	39,8 %

Zu beiden Versuchen wurde ein sehr guter fettfreier Eiter genommen. Eine eigentliche qualitative Untersuchung der Stoffe des Alkoholextractes habe ich auf spätere Zeit und bessere Gelegenheit zur Gewinnung von Material verschieben müssen. Nur über zwei Punkte habe ich Versuche angestellt.

Die älteren und neueren Angaben über phosphorhaltige Fette¹, Protagon (Fischer), Glycerinphosphorsäure etc. machten es längst zur Gewissheit, dass Lecithin oder ein sehr ähnlicher Körper in den Zellen enthalten sei. Ich selbst habe Neurin und Glycerinphosphorsäure auch aus kleinen Eiterportionen in merklicher Menge erhalten. Um wenigstens einen vorläufigen Aufschluss über die Quantität des Lecithins zu erhalten, habe ich an dem schon erwähnten Alkoholextract Nr. II. eine P bestimmung angestellt.

1,799 gr. Alkoholextract gaben $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ 0,1070 = 3,804 % P_2O_5 Berechnet man daraus nach der von Diakonow gegebenen Formel (beispielsweise für Distearinlecithin) die Menge des Lecithins, so erhält man 44,28 % des Alkoholextractes, 17,6 % der ganzen trockenen Eiterzellen an Lecithin. Diese Zahl ist nicht sehr abweichend von der für den Hühnereidotter nach Parke's Analysen berechneten.² Parke berechnete aus dem P gehalt des Alkohol- und Aetherextractes 52% der festen Bestandtheile des Hühnereidotters an Protagon, = 20, 7% an Lecithin.

Eine wichtige Frage ist die, ob der Lecithingehalt eine annähernd constante Grösse darstellt, oder ob er je nach dem Entwicklungsstadium der Zellen bedeutend variirt. Man wird daraus schliessen können, ob das Lecithin eine eigentliche physiologische Function als nothwendiges chemisches Constituens der lebenden Zellen besitzt oder ob es bloss Product einer secundären, mehr regressiven Metamorphose ist, ein Zwischenproduct zwischen Gewebsbildnern und den Endproducten des Gewebeerfalls. Eine kleine Versuchsreihe an Lymphzellen, farblosen Blutzellen, Eiterzellen in verschiedenen Stadien der Degeneration würde entscheidend sein.

Ausser der Frage nach dem Lecithin habe ich nur noch einen Versuch mit dem in Aether unlöslichen Theil des Alkoholextractes angestellt. Derselbe wurde, um ungelöstes Lecithin zu entfernen, mit Barytwasser gekocht, der Rückstand mit warmem Alkohol digerirt; die alkoholische Lösung setzte

¹ z. B. bei Boedecker, Zeitschrift f. rnt. Med. Neue Folge. VI. pag. 191.

² Medicinisch-chemische Untersuchungen, II. p. 213.

leaving a flaky, crumbly residue. The quantitative proportions of the extract to the depleted residue was obtained as follows in two experiments. The yield from 100 parts of dried pus material (calculated to be free of sodium sulphate) was:

Residue, dried at 100°C	Vacuum dried ether extract.
I. 59.2 %	40.8 %
II. 60.2 %	39.8 %

In both experiments a good quality fat-free pus was used. I have had to postpone a thorough qualitative examination of the material in the alcoholic extract for a later date and until a better opportunity for obtaining material presents itself. I have only investigated two points.

Previous and recent details about phospholipids, protagon^k (Fischer¹), phosphoglyceric acid etc., have confirmed that pus cells contain lecithin^l or a very similar compound. I myself have obtained neurin^m and phosphoglyceric acid in significant quantities from small amounts of pus. In order to obtain at least some preliminary information about the amount of lecithin in pus, I have already assayed the amount of phosphorus in the previously aforementioned alcoholic extract (II).

1.799g of alcoholic extract gave $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ [Magnesium pyrophosphate] 0.1070 = 3.804% P_2O_5 [Phosphorus pentoxide].ⁿ If one calculates the amount of lecithin using the formula proposed by Diakonow,^o (for example, for distearic lecithin), lecithin makes up 44.28% of the alcoholic extract and 17.6% of completely dried pus cells. These figures do not deviate too much from those that calculated from Parke's analysis of hen egg yolk.² From the phosphorus content of the alcoholic and etheric extract, Parke calculated that an integral portion of hen egg yolk was 52% protagon and 20.7% lecithin.

An important question is whether the amount of lecithin is constant or if it shows significant variation during the stages of cellular development. With this information, one would be able to conclude whether lecithin possesses an actual physiological function as an essential chemical component of the living cell, or whether it is simply the product of secondary, more regressive metamorphosis, an intermediate between tissue-forming agents and the end products of tissue disintegration. A small series of experiments on lymph cells, white blood cells, and pus cells in different stages of degeneration would be decisive.

Aside from addressing the question of lecithin content, I have performed only one other experiment with the ether-insoluble portion of the alcoholic extract [of the pus cells]. In order to remove undissolved lecithin, this portion was boiled with barium hydroxide solution and the residue treated

¹ eg. Boedecker, Zeitschrift f. rat. Med. Neue Folge. VI. p. 191.

² Medicinisch-chemische Untersuchungen, II. p. 213.

beim Erkalten weisse Flocken ab, die aus Conglomeraten von Kugeln und Drusen deutlich nadelförmiger Krystalle bestanden. Diese, nochmals aus heissem Alkohol umkrystallisirt., mit kaltem Alkohol und mit Aether gewaschen, stellten eine weisse, seifig anzufühlende Masse dar, die in Wasser ein wenig quoll und 11och Baryt enthielt. - Diese Substanz wurde mit verdünnter Schwefelsäure eine Stunde lang gekocht. Die Stücke schmolzen dabei zu graulichen [p. 450] Kugeln. Die von diesen abgegossene Lösung, nach Entfernung der Schwefelsäure eingedampft, gab mit Kupfervitriol und Natronlauge, sowie mit Wisrnnth sehr starke Rcduction. Diess würde für das Vorkommen des Cerebrins oder eines ähnlichen Körpers sprechen, wie ja auch Fischer¹ seine Angaben über Protagon auf die Auffindung eines in warmem Alkohol löslichen Körpers stützt, der mit Säuren gekocht, Zucker gibt. Uebrigens wird auch die Eiterzelle nicht mehr als Zufluchtsstätte für den Protagonbegriff im Sinne von Liebreich dieuen können, da der Phosphorgehalt des noch viele anderweitige Stoffe enthaltenden Alkoholextractes immer noch merklich höher ist, als der des reinen Liebreich'schen Protagens.

3. Das Wasserextract.

Die mit Alkohol extrahirten Zellen wurden mehrmals auf Glutin und Chondrin oder deren Muttersubstanzen untersucht, durch längeres oder kürzeres Auskochen mit Wasser. Niemals habe ich beim Einengen der Flüssigkeit auch nur eine Spur von Gallerte bekommen; niemals aus neutraler Lösung eine Fällung mit Essigsäure. Der Rückstand war überhaupt unbedeutend. Tannin- und Bleifällungen ergaben sich wohl noch; auf merkliche Spuren von Albuminstoffen deutete starke Fällung mit Ferrocyankalium und Essigsäure. Herr Prof. Hoppe - Seyler sprach damals gegen mich die Ansicht aus, dass man aus blossen Fällungen mit Metallsalzen in Gemengen wenig bekannter Stoffe die Leimarten nicht sicher erkennen könne; die Gallertbildung sei der einzige gute Anhaltspunkt. Ich will indess (namentlich mit Hinblick auf die Angabe von Bödecker²) nicht läugnen, dass unter gewissen Umständen, Yielleicht bei beigemengten, wenn auch molecularen Gewebstrümmern, auch jene Bestandtheile von Intercellularsubstanzen im Eiter zu finden sei u können.

4. Die Aschenbestandtheile.

Ich habe bis jetzt nur eine Analyse gemacht: auch diese ist zum Theil an etwas zu geringer Suhstanzmenge angestellt (nach den Methoden von Hoppe-Scylcr's Handbuch). Ich thrile daher die Resultate als vorläufige nur mit Vorbehalt mit. Bei Bestimmung der Alkalien und des Chlors der Asche, wurde die oben erwähnte halb gesättigte Lösung von salpetersaurem Baryt

¹ Med. Centralblatt 1865. p. ,25.

² Zeitschrift für rationelle Medicin. Neue Folge. Band VI. p. 196.

with warm alcohol. Upon cooling the alcoholic solution gave a precipitate of white floccules, which contained conglomerates of spheres and druses^p of distinct needle-like crystals. When recrystallised from hot alcohol, washed with cold alcohol and ether, these floccules formed a white mass that was soapy to the touch, swelled up slightly in water, and still contained barium hydroxide. This substance was boiled for an hour with dilute sulphuric acid. The particles then melted into grey spheres. After removal of sulphuric acid by evaporation, treatment of the decanted solution gave a very strong reducing reaction when treated with with copper sulphate and, sodium hydroxide, plus bismuth. This reducing reaction would indicate the presence of cerebrin or similar substances in the same way that Fischer¹ based his statements about protagon on the discovery of particles that are soluble in warm alcohol and that yield sugar on boiling with acid. Incidentally, this finding means that pus cells can no longer serve as a refuge for the protagon concept as conceived by Liebreich, because the phosphorus content of many other substances contained in the alcoholic extract is still noticeably higher than that of pure Liebreichian protagon.^q

3. The Aqueous Extract

The cells extracted with alcohol were examined repeatedly for glutin, chondrin, and substances from which they originated by boiling in water for longer or shorter periods. When concentrating the liquid I never once detected a trace of jelly; nor did acetic acid result in any precipitate from neutral solution. The residue was not at all significant. Tannic acid and lead precipitates were still evident; considerable precipitation with potassium ferrocyanide and acetic acid indicated noticeable traces of albuminous substances. At the time, Prof. Hoppe-Seyler challenged my opinion by maintaining that one could not simply use precipitation with metal salts to identify mixtures of little-known gelatinous substances. The formation of the jelly-like substance is the only good clue, however. I do not wish to deny (particularly in view of Bödecker's results²) that, under certain conditions, it might be possible to find in pus, molecular tissue debris admixed with components of intercellular substances.

4. Composition of the Ash Portion

Until now I have conducted only one analysis, and even that using a somewhat limited amount of material obtained (using the methods described in Hoppe-Seyler's handbook). I therefore share these results only as provisional and with reservations. The aforementioned semi-saturated solution of barium hydrochloride was used for the determination of alkali and chlorine in the ash.

¹ Med. Centralblatt 1865. p. ,25.

² Zeitschrift für rationelle Medicin. Neue Folge. Band VI. p. 196.

zum Auswaschen verwendet. Die alkalischen Erden und das Eisen wurden nach Auswaschung mit Glau- [p. 451] bersalz bestimmt. Es versteht sich von selbst, dass beide Salze auf ihre Reinheit in dieser Richtung geprüft wurden. Eine Schwefelsäurebestimmung ergab nach Anbringung einer Correction für den anderweitig bestimmten P gehalt der organischen Substanz die Menge des beigemengten Glaubersalzes. Ebenso diente im andern Falle eine Barytbestimmung zur Correction. 100 Theile der so berechneten bei 110° getrockneten Eiterzellen ergaben :

ClNa	:	0,1428
Na ₂ O	:	0,2625
K ₂ O	:	0,6546
CaO	:	0,0830
MgO	:	0,0870
Fe ₂ O ₃	:	0,0390
		1,2689

Es wird am Platze sein, hier die Phosphorsäurebestimmungen anzuführen, die ich nach Verbrennung mit Solla und Salpeter angestellt habe.

trockene (corigate) Substanz	gefundene pyroosphorsäure Magnesia	Phosphorsäure
I. 2,9490	0,1240	2,689 %
II. 1,9127	0,0831	2,778 %

In Versuch Nr. II. zur Bestimmung des Alkoholextractes hatte ich die Phosphorsäure im Extract und des Rückstandes getrennt bestimmt; es ergab sich als Gesamtergebnis:

III. 4,6318 gaben PO₅ 2,800 %

Davon waren nach Abrechnung der PO₅ im Extract auf den in Alkohol unlöslichen Rückstand zu beziehen 1,323 % der gesumten trockenen Zellen. Bernchnet man die Phosphorsäure an die Erden als dreibasisch, an die Alkalisch als zweibasisch, so erhält man (mit Vernachlässigung etwaiger Spuren von SO₃):

An die Basen (nach Abrechnung von Na für das Chlor) gebundene Phosphorsäure	1,009 %
Es würde daun bleiben ein nicht gedeckter Hest	0,314 %
oder wenn man den mindesten Werth unter den P bestimmungcu in Anschlag bringt	0,203 %

Die constanten Hesultate der drei Phosphorbestimmungen geben wohl ein Recht. auf diesen Umstand aufmerksam zu sein. Wir werden

Alkaline earth metals and iron were determined after washing with sodium sulphate. It goes without saying that both of these salts were tested for their purity. After correcting for the phosphorus content of the organic substance established by other methods, an assay with sulphuric acid gave the amount of sodium sulphate contaminating the mixture. In other cases, this correction was obtained with a barium sulphate assay. Thus calculated, 100 parts of pus cells dried at 110°C gave the following [results]:

NaCl	[Sodium chloride]	:	0,1428
Na ₂ O	[Sodium oxide]	:	0,2625
K ₂ O	[Potassium oxide]	:	0,6546
CaO	[Calcium oxide]	:	0,0830
MgO	[Magnesium oxide]	:	0,0870
Fe ₂ O ₃	[Ferric oxide]	:	0,0390
	Total		1,2689

At this point it may be useful to mention the amounts of phosphoric acid [left in the ash] after combustion, which I determined using sodium carbonate and potassium nitrate.

Dry substance	Detectable magnesium pyrophosphate	Phosphoric acid
I. 2.9490	0.1240	2.6890 %
II. 1.9127	0.0831	2.7780 %

In the analysis of the alcoholic extract in Experiment 2, I determined the phosphoric acid in the extract and the residue separately; the combined result gave:

III. 4.6318 gave 2.800% phosphoric acid.

Of the alcohol insoluble residue, 1.323% was comprised of the collected dried cells, as calculated after correcting for phosphoric acid in the extract. If one treats the phosphoric acid bound to alkaline earth metals as tribasic, and those bound to alkalis as dibasic in the calculations, then one obtains (with negligible traces of sodium sulphite):

1.009% phosphoric acid bound to alkali (after accounting for sodium for chlorine)

There would then be a remaining 0.314% that is not accounted for.

Or, if we take into consideration the minimum value obtained from determination of phosphorus, we get 0.203%.

Given the consistent results of the three different assays for phosphorus, [we believe] them to merit attention. We will [return to the matter of this]

diesen Phosphor später wieder finden. Wenn auch nicht behauptet werden kann, dass die gefundenen Aschenbestandtheile die volle Menge der in den Eiterzellen enthaltenen Salze darstellen, so ist doch immerhin, wie bei den ausgeilaschenen Blutkörperchen, das Resultat be-[p. 452] merkwürdig. Es ist gewiss keine gleichgültige Thatsache, dass die Zellen eine verhältnissmässig beträchtliche Menge (1,86 %) löslichen, von der Waschflüssigkeit differenter Salze hartnäckig zurückhielten. Ausgewaschene Blutkörper haben dieselbe Erscheinung gezeigt. Wie hoch der Einfluss der Waschflüssigkeit zu taxiren ist, würde eine combinirte Analyse von Gesamteiter, Zellen und filtrirtem Serum lehren, zu der sich mir keine Gelegenheit darbot. Die Analyse zeigt nun, dass das Chlor, wenn gleich sehr zurücktretend, den Zellen doch nicht ganz fehlt. Auch das Natron ist vorhanden, in nicht unerheblicher Menge, zu deren Deckung das Chlor bei weitem nicht hinreicht. Auffallend tritt, wenn man die Frage der Umwandlung der farblosen Blutkörper in farbige ins Auge fasst, der geringe Gehalt von Eisen hervor, während sonst eine gewisse annähernde Uebereinstimmung mit den Blutkörperchen sich zeigt. Wenn man übrigens das bedeutend grössere Volum der Eiterzellen im Verhältniss zu den farbigen Blutkörperchen in Anschlag bringt, lässt sich vielleicht nachweisen, dass der Eisengehalt dennoch hinreicht, um das Eisen des Blutfarbstoffs herzuleiten.

Die unter den oben angegebenen Annahmen berechneten Aschenbestandtheile ergeben sich also folgenderrnassen auf 100 Theile trockener Eiterzellen :

Phosphorsaure Erden und Eisen	.	.	.	0,4160
Phosphorsaures Natron	.	.	.	0,6063
Phosphorsaures Kali	.	.	.	1,2010
ClNa	.	.	.	0,1428
				2,3661

eine allerdings etwas niedrige Gesamtzahl, mit Hinblick auf die Aschenquantitäten anderer Gewebe.

5. Die Kerne und das Nuclein.

Ein aus reinen Zellen bestehendes Material, wie das vorliegende, musste vor Allem dazu einladen, die Frage nach der chemischen Constitution der Zellkerne einmal ernstlich in Angriff zu nehmen. Ich habe oben erwähnt, dass man aus den Zellen durch Extraction mit sehr verdünnter Sodalösung unter Anderem eine Substanz in Lösung erhält, welche durch Säure ausgefüllt, weder in Säureüberschuss, noch in Salzen, wohl aber in jeder Spur eines caustischen oder kobleusuren Alkali sich wieder löst. Den bekannten histochemischen Thatsachen gemäss musste ich derartige Stoffe zunächst den Kernen zuschreiben. Es gelang mir aber nicht, diese Substanzen durch Behandlung

phosphorus again later. Even though we cannot claim that the ash components found represent the full range of salts contained in pus cells, the results, as in the case with washed out blood cells, are still remarkable. It is certainly not irrelevant that the cells stubbornly retained a comparatively considerable amount (1.86%) of soluble salts, separate from the washing solution. Washed blood-corpules appeared the same. To estimate the extent to which the washing solution exerts an influence would require a combined analysis of the total pus—cells and filtered serum together – an opportunity which has not yet presented itself to me. The analysis shows that the chlorine, although very much diminished, is not completely absent in cells. Sodium bicarbonate is also present in not inconsiderable amounts, although the chlorine is by no means enough to [neutralise] it. Strikingly, if one considers the question of the conversion of the colourless blood cells into colored ones, one sees a low content of iron emerges, whereas otherwise there is a certain correlation between [iron content] and the blood cells. If one considers the significantly larger volume of pus cells in relation to blood cells, it perhaps proves that the iron content is sufficient to account for the iron of blood colour.

Based on the aforementioned assumptions, components were calculated from 100 parts pus cells in the following way:

[Alkaline earth metal] and iron phosphates	.	.	.	0.4160
Sodium phosphate	.	.	.	0.6063
Potassium phosphate	.	.	.	1.2010
Sodium chloride	.	.	.	0.1428
				2.3661

[which is] a somewhat low total, compared to the quantities of ash from other tissues.

5. The Nucleus and Nuclein

A material consisting of pure cells, such as that available, must above all invite one to tackle the question of the chemical constitution of the cell nucleus in earnest. Earlier I mentioned how by using very dilute solutions of sodium carbonate, one obtains from cells a dissolved substance which precipitated in acid, but not in an excess of acid nor with salts, and redissolved [in the presence of even] the slightest trace of a caustic or carbonic alkali. In accordance with known histochemical facts, I had to attribute this substance to the nuclei. But I was unsuccessful in separating these substances from admixed proteins by treatment with dilute acids. There remained a turbidity

mit verdünnten Säuren in befriedigender Weise von beigemengten Eiweiss- [p. 453] stoffen zu trennen. Es blieben unfiltrirbare, schwer zu behandelnde Trübungen zurück. Ich versuchte daher die Kerne selbst zu isoliren.

Zuerst wandte ich zu diesem Behufe die ganz verdünnte Salzsäure an, von der angegeben wird, dass sie bei längerer Einwirkung das Protoplasma mit Hinterlassung der nackten Kerne auflöse. Aber wie schon bei der Schilderung der Eiweissstoffe bemerkt wurde, das Resultat war ein unvollkommenes. Einige Kerne waren zwar nach mehrtägiger Behandlung fast immer isolirt, zuweilen ziemlich viele; aber an der Mehrzahl hafteten, auch wenn die Flüssigkeit 6-10 mal gewechselt wurde, Reste des Protoplasma hartnäckig an, während die Säure nur noch Spuren von Eiweissstoffen anfaß. Dabei war die Absetzung der ungelösten Reste unvollständig, die Filtration langwierig und mühsam. Essigsäure gab noch schlechtere Ergebnisse.

Auf einem mehr mechanischen Wege habe ich aus den (bei Winterkälte) wochenlang mit der verdünnten Salzsäure behandelten Zellen kleine Portionen von Kernen erhalten. Ich schüttelte den ungelösten Rückstand lange und heftig mit Aether und Wasser; die Masse der noch mit Protoplasmaesten versehenen Zellen sammelte sich in der Grenzschicht zwischen beiden Flüssigkeiten; am Boden der wässrigen Schicht aber sah man nach einiger Zeit ein feines Pulver abgesetzt. Dieses konnte auf dem Filter gesammelt werden und bestand aus vollkommen reinen Kernen, mit glatter Contour, homogenem Inhalt, scharf gezeichnetem Nucleolus, im Vergleich zu ihrem ursprünglichen Volumen etwas verkleinert. Durch Schlitteln mit neuen Portionen Wasser konnten aus den Zellen wiederholt neue, immer aber sehr kleine Quantitäten von Kernen gewonnen werden. Ein höheres specifisches Gewicht der Kerne im Vergleich zum Protoplasma mag wohl die Ursache dieser Scheidung sein.

Die so erhaltenen Kerne blieben völlig unverändert in reinem Wasser; in sehr verdünnten alkalischen Flüssigkeiten aber quollen sie stark und wurden blass; auch das Kernkörperchen wurde blass und unsichtbar. Säurezusatz brachte die alten Formverhältnisse wieder hervor. Auch in ClNa Lösungen quollen die Kerne etwas. Jod färbte sie stark gelb. Die genannten verdünnten Sodalösungen zogen aus den Kernen eine gelbliche Lösung einer Substanz aus, die durch verdünnte A oder ClH einen im Ueberschuss dieser Säuren unlöslichen flockigen Niederschlag gab. Dieser Niederschlag quoll in reinem Wasser durchaus nicht, löste sich aber in der geringsten Spur von caustischem oder kohlensaurem Alkali, sowie auch in gewöhnlichem phosphorsaurem Natron zu einer beim Kochen klar bleibenden Flüssigkeit auf, nicht aber in ClNa und andern Mittelsalzen. Er gab, auch wenn die Kerne sorgfältig ausgewaschen waren, mit Salpetersäure die Xanthoproteinreaction,

that could not be filtered and was difficult to handle. Therefore, I tried to isolate the nuclei myself.

For this purpose, I used highly dilute hydrochloric acid, prolonged exposure to which has been said to leave behind naked nuclei. But as was evident from the appearance of the proteins, the result was incomplete. Some nuclei, sometimes quite a number, were almost always isolated after several days of treatment. But on the whole, even when the liquid was changed 6-10 times, residual protoplasm remained persistently adhered to the nuclei, while acid removed only traces of protein. Moreover, the undissolved residue did not settle down completely [due to which] the filtration was tedious and tiring. Acetic acid gave even worse results.

Using a more mechanical technique, I obtained small portions of nuclei from the cells that were treated for weeks with ice-cold hydrochloric acid. I shook the undissolved residue long and hard with ether and water; the mass of cells still adhered to protoplasm collected at the interface between the liquids; after a certain time however, a fine powder was seen deposited on the bottom of the aqueous layer. This deposit, which could be collected on the filter, consisted of completely pure nuclei with smooth contours, homogenous contents, and a sharply defined nucleolus, all somewhat reduced in size compared to their original volume. By shaking with fresh portions of water, new but always small quantities of nuclei could be prepared from the cells. A higher specific weight of the nuclei compared to the protoplasm may well be the cause of this separation.

The nuclei obtained in this way remained completely unchanged in pure water; in highly dilute alkaline liquids, however, they became very swollen and pale; the nuclear bodies also became pale and indiscernible. The addition of acid restored them to their original form. The nuclei also swelled somewhat in solutions of sodium chloride. Iodine coloured them a strong yellow. The aforementioned solution of sodium carbonate drew from the nuclei a yellow solution of a substance which, in an excess of dilute ether or hydrochloric acid gave an insoluble flocculent precipitate. This precipitate did not swell up in pure water, but dissolved in the smallest trace of caustic or carbonic alkali as well as in ordinary phosphate soda^r - but not in sodium chloride and other neutral salts to give a liquid which remained clear on boiling. Even when the nuclei were carefully washed with nitric acid, the precipitate gave the xanthoproteic reaction,^s and in sodium and copper sulphate it gave a blue,

mit "Natron und Kupfervitriol eine blaue, ins Violette spielende Lösung. In rauchender Salzsäure löste er sich; der beim Verdünnen entstehende Niederschlag löste sich in vielem Wasser nicht wieder auf. - Der Körper erwies sich demnach als den leichten Eiweissstoffen zwar verwandt aber nicht angehörig; die Reactionen, abgesehen von dem gänzlichen Mangel an Quellbarkeit oder Löslichkeit in neutralem Wasser, stimmten in soweit mit dem Eichwald'schen Mucin überein.

Auf dem Filter blieb, auch in concentrirteren Sodalösungen unlöslich, eine Substanz zurück, welche nach dem Trocknen mit Alkohol und Aether als Colodionartiges Häutchen sich vom Filter abziehen liess und unter dem Mikroskop noch die Contouren der Kerne mit ihren Kernkörperchen undeutlich zeigte. Dieses Häutchen war, wenn auch nicht augenblicklich, löslich in concentrirter Salzsäure und in caustischen Alkalien, blieb dagegen beim stundenlangen Erhitzen mit Eisessig auf 140° im zugeschmolzenen Glasrohr völlig unverändert (im Gegensatz zu den Keratinsubstanzen). Nach diesen Löslichkeitsverhältnissen war eine gewisse Aehnlichkeit mit der elastischen Substanz zu vermuthen. Die minimalen auf dem beschriebenen Wege erhaltenen: Mengen von Kernen gestatteten kaum die genannten wenigen Reactionen; an Elementaranalysen war nicht zu denken.

Ich griff daher zu einem Mittel, dessen energische Eiweiss lösende Wirkung auch schon Anwendung in der Chemie der Albnminkörper gefunden¹ zu pepsinhaltigen Flüssigkeiten. Ich bediente mich eines Klarfiltrirten mit 10 ccm. rauchender Salzsäure auf 1 Liter Wasser bereiteten Extractes aus Schweinemagen. Die directe Behandlung frisch ausgewaschener EitPrzellen mit dieser Flüssigkeit bei 40° ergab kein befriedigendes Resultat. Die Hauptmasse löste sich, aber eine Menge öligere Tropfen wurden frei, zum Theil wohl durch die Zersetzung des Lecithins und hielten den ungelösten Rückstand als kaum filtrirbare Trübung suspendirt. Ich liess daher eine mehrmalige, gewöhnlich 3-4 malige längere Digestion mit warmem Alkohol vorausgehen und unterwarf dann den nun Lecithin fast ganz befreiten Rückstand der Verdauung zwischen 37 und 45°. Schon nach einigen Stunden hatte sich ein fein pulverig graulicher Bodensatz von einer klaren gelblichen Flüssigkeit geschieden. Um einer vollständigen Einwirkung sicher zu sein, liess ich die Verdauung während 18-24 Stunden andauern, während welcher ich die Flüssigkeit zweimal abgoss und wechselte. Nach [p. 455] der zweiten Extraction trat in Menge und mikroskopischer Beschaffenheit des Sedimentes keine sichtliche Aenderung mehr ein. Das Sediment bestand lediglich aus isolirten Kernen, ohne irgend eine Spur von Protoplasmaresten. Zuweilen waren einige feine mässig lichtbrechende Körnchen heimgemengt, die aber beim Auswaschen grösstentheils durchs Filter gingen. War die Extraction

¹ Kühne und Rudnew, zur Chemie der amyloiden Gewebentartung, Virch. Arch. XXXIII. pag. 66.

almost violet, solution. It dissolved in fuming hydrochloric acid; [but] the precipitate formed on dilution did not redissolve in large volumes of water. This material thus, proved itself to be related to pure protein but not belonging to [the same chemical category]; aside from their complete inability to swell or dissolve in water, the reactions were consistent with Eichwald's mucin.¹

On the filter there remained a substance which was also insoluble even in concentrated solutions of sodium carbonate, and after drying with alcohol and ether was peeled from the filter as a collodion-like membrane and which under the microscope still showed the contours of the nuclei with their nucleolus. Although not instantaneous, this membrane was soluble in concentrated hydrochloric acid and in caustic alkalis, but remained completely unchanged in a sealed glass tube heated with glacial acetic acid for hours at a time (in contrast to the keratin substances). One might assume a recognisable similarity to the elastic substance from this pattern of solubility. The minimal quantities of nuclei obtained by the described methods barely allowed for the determination of the few aforementioned reactions; an analysis of their elements was out of the question.

I therefore resorted to using an agent—a pepsin solution—the powerful effect of which to dissolve proteins has already been applied in the chemistry of albuminous bodies.¹ I used a clear filtrate with 10 ml. fuming hydrochloric acid per litre of pig's stomach extract prepared with water. The direct treatment of freshly washed pus cells with this liquid at 40°C did not give a satisfactory result. The main mass dissolved, but a large quantity of oily drops were liberated partly due to the decomposition of lecithin, and the undissolved residue was suspended as a turbidity that was barely filterable. I therefore preceded a repeated, usually 3-4 times longer, digestion with warm alcohol and then subjected the residue, almost completely freed of lecithin, to digestion at 37-45°C. Within several hours, a fine powdery greyish sediment had separated from a clear yellowish liquid. In order to be certain that the reaction was complete, I let the digestion proceed for 18-24 hours, during which time I decanted and changed the liquid twice. After the second extraction, however, there was no change in the quantity or microscopic composition of the sediment. The sediment was composed solely of isolated nuclei with no trace of protoplasm. On occasion, some fine, moderately refractive granules were mixed in but these were mostly removed by washing through the filter. If the alcohol extraction was not carried out to completion, then some droplets of oil became noticeable. The sediment was shaken again several times with fresh volumes of ether to remove any traces of fat. After

¹ Kühne and Rudnew, 'On the chemistry of amyloids' *Virchow Archives* 33, p.66.

mit Alkohol nicht erschöpfend gewesen, so machten sich auch einige Öltröpfchen bemerklich. Der Bodensatz wurde nun noch mehrmals mit erneuten Portionen Aether geschüttelt, um diese Ueste von Fett zu entfernen. Nachdem die letzte Aetherportion abgegossen, liessen sich die Kerne leicht auf dem Filter sammeln als lehmartige graue Masse und mit Wasser beliebig auswaschen, wobei sie sich durchaus nicht veränderten. Die Auswaschung wurde fortgesetzt, bis Tannin das Filtrat nicht mehr trübte.

Mittelst der hier angegebenen Methode habe ich, sobald ich einmal über die nöthigen Cautelen ilh Klaren war, aus Eiterzellen die Keme mit vollkommener Sicherheit in beliebigen Mengen gewinnen können. Die so erhaltenen Kerne sind vollkommen nackt, aber, wenigstens grossentheils, nicht so glatt, als die durch blosse Salzsäure isolirten. Vielmehr zeigen sie, obwohl ihr Volumen nicht auffallend von den oben erwähnten Kernen abweicht, ein etwas geschrumpftes, verschieden stark lichtbrechendes Aussehen, manche wie eine ungleichnässig verdickte Membran, oder das Bild körniger Trübung darbietend, ungewiss, ob durch Veränderung des Inhalts oder Runzelung und Rauigkeit der Oberfläche. Die Contouren, bei Manchen glatt, sind bei Andern wie leicht angefressen. - Wenn die Trübung weniger ausgesprochen ist, so tritt das Kernkörperchen deutlich hervor. Die so erhaltene ausgewaschene Masse wurde nun noch mehrmals mit warmem Alkohol behandelt, Der Alkohol nahm bei der ersten Extraction geringe Mengen einer beim Verdunsten ölig weich brillunlich zurückbleibenden Substanz auf, die in Aether mit Hinterlassung eines geringen krümligen Restes langsam löslich war. Diesem Verhalten nach Latte sie am meisten Aehnlichkeit mit Lecithin; leider habe ich Yersäumt, sie auf Phosphor zu untersuchen. Schon die dritte Extraction nahm aber keine nennenswerthe Spur mehr auf.

Die so gereinigte Kernmasse verhielt sich, abgesehen vorn mikroskopischen Verhalten, wie die durch verdünnte Salzsäure isolirten Kerne. Sie gab mit verdünnter Sodalösung eine gelbliche Flüssigkeit, aus der durch Essigsäure oder Salzsäure ein im Säureüberschuss unlöslicher Niederschlag gefällt wurde. Das saure Filtrat gab weder bei der Neutralisation, noch mit Blutlaugensalz eine Trübung. Der grössere Theil der Substanz blieb ungelöst zurück, war aber in caustischen [p. 456] Alkalien, wenn auch langsam, löslich. Dass nicht der Alkohol oder die Kochhitze die Ursache des Unlöslichwerdens war, erhellt ans dem ganz identischen Verhalten der blos mit Salzsäure isolirten Kerne. Die Veränderung im mikroskopischen Aussehen mag vielmehr auf einerdurch den Alkohol bewirkten Extraction einer Substanz beruhen, wie ich glauben möchte, des Lecithins. Verschiedene Kerne zeigen sich ungleich getrübt; die Quantität extrahirbaren Stoffes mag daher, vielleicht je nach Entwicklungsstadien des Kerns, variiren.

the last volume of ether was decanted, the nuclei could be easily gathered on the filter as a clay-like grey mass and then eluted at will, during the course of which procedure they showed no alteration. The elution was continued until tannin caused no more cloudiness in the filtrate.

As soon as I was clear about the necessary precautions, I was able to obtain nuclei in any amount with complete certainty using the methods described here. The nuclei obtained in this way are completely naked but, for the most part at least, not as smooth as those obtained using only hydrochloric acid. Rather, although their volume does not deviate noticeably from the nuclei mentioned above, they show a somewhat shrunken appearance with varying degrees of refractivity, some having an unevenly thickened membrane, or presenting a grainy opacity; which may be due to an alteration in their composition or a roughness and wrinkling of their surface, although I cannot be sure of the reason. The [surface] contours, which are smooth in some cases, are lightly ragged in others. When the turbidity is less pronounced, then the nuclear bodies appear more distinct. The eluted material obtained in this way was now treated several times with warm alcohol. Evaporation after the first extraction with alcohol left a small amount of an oily soft brownish substance, which dissolved slowly in ether, leaving a small, crumbly residue. This behaviour had the most similarity with lecithin; unfortunately I failed to examine them for phosphorus. By the third extraction no significant traces were left.

With the exception of their microscopic properties, the nuclei purified by this method behaved like those isolated using diluted hydrochloric acid. With diluted solutions of sodium carbonate they gave a yellow liquid from which an insoluble precipitate could be obtained using an excess of either acetic acid or hydrochloric acid. The acidic filtrate did not turn turbid on neutralisation or treatment with blood lye salt.^u The largest portion of the substance remained insoluble but was soluble, albeit slowly, in caustic alkali. That neither alcohol nor boiling was the cause of this solubility was demonstrated by the fact that nuclei isolated with only hydrochloric acid behaved in an identical manner. Rather, the change in microscopic appearance may be due to the extraction of a substance by the alcohol, which I would like to believe is lecithin. Different nuclei show uneven turbidity; the quantity of extractable material may therefore vary, perhaps depending on the stages of development of the nucleus.

Der in Sodalösung lösliche Körper zeigte die oben bei der Salzsäureisolation angeführten mucinähnlichen Reactionen, auf die ich daher verweise. Ich habe indessen nie grössere Mengen davon darstellen können; die Filter wurden durch den gequollenen Hückstand verstopft, und wenn die Operation lange dauerte, hatte sich der Stoff in der Lösung verändert; es hatten sich Produkte gebildet, die wohl durch Tannin, nicht aber durch Essigsäure füllbar waren. Die gewonnene kleine Menge habe ich zu einer N bestimmung verwendet. Ich habe mich daher später mit meinen Versuchen an die ganzen Kerne gehalten, die Trennung der Körper, die ich einstweilen ohne weiteres Prijudiz als lösliches und unlösliches Nuclein bezeichnen will, einem günstigeren Material überlassend.

Die gereinigten Kerne sind, wenn auch nicht momentan, doch vollständig löslich in concentrirter Salzsäure. Hat die Einwirkung nur kurze Zeit gedauert, so füllt beim Verdünnen mit Wasser fast die ganze Substanz flockig wieder aus, in viel Wasser unlöslich; das Filtrat setzt indess doch bei Zusatz von Ferrocyankalinlösung, sowie bei der Neutralisation einige Flocken ab und das Filtrat von letzteren wird durch Tannin etwas getrübt. Bei längerer Einwirkung vermehren sich diese Umwandlungsprodukte und schliesslich erhält man beim Verdünnen, sowie mit Blutlaugensalz gar keinen Niederschlag mehr, höchstens noch mit Tannin. Die Lösung hat dann zuweilen eine purpurrothe Färbung.

Aehnlich verhält sich die Einwirkung caustischer Alkalien, welche die Kerne völlig lösen. Anfangs fällt beim Ansäuern mit überschüssiger ClH oder A fast Alles wieder aus; der Niederschlag ist nun aber auch in der Verdünntesten Sodalösung sehr leicht löslich. Ich ziehe daraus die Vermuthung, dass das lösliche und das unlösliche Nuclein nicht wesentlich verschiedene, sondern nur Modifikationen sein möchten, die leicht in einander übergehen können, - weitere Prüfung natürlich vorbehalten. Auch hier gab das saure Filtrat sowohl bei Neutralisation als mit Blutlaugensalz eine Trübung. Als ich aber einmal mässig verdünnte Natronlauge mehrere Tage einwirken liess, gab die Lösung [p. 457] neutralisirt, eine reichliche, in ClH 1/1000 und A dilut. fast vollständig lösliche Fällung; aber auch das neutrale Filtrat von dieser wurde durch Tannin stark getrübt. Es ist diess mir ein Beleg, dass die obige Albuminähnliche Reaction bei kurzer Einwirkung gleichfalls nicht so ohne weiteres auf Eiweissbeirngungen zu beziehen ist. Vielmehr scheinen sich wirklich als Zwischenstufe der Umwandlung aus Nucleinstoffen Albuminat- oder Syntoninähnliche Substanzen bilden zu können, in letzter Linie aber Produkte, wie man sie gewöhnlich nach meist negativen Reactionen als Peptonartige zusammenwirft. - Welche Stufe der Umwandlung ich indess erhalten erhielt, habe ich im einzelnen Falle nicht

I will also mention the bodies that were soluble in sodium carbonate as they showed the aforementioned mucin-like reactions obtained by isolation with hydrochloric acid. I have never, however, been able to produce them in large quantities; the filters became clogged due to swollen residue and when the procedure took a long time, the products formed were precipitated by tannin but not by acetic acid. I used the small amount obtained to determine the nitrogen content. I therefore limited my later experiments to whole nuclei, leaving the separation of the bodies which I want to designate, for the time being without further prejudice, as soluble and insoluble nuclein, [to experiment on when I have] more convenient material.

The purified nuclei are, completely, if not instantaneously, soluble in hydrochloric acid. If the acid acts only for a short time, almost the entire substance precipitates once again when diluted with water, and is insoluble in large amounts of water. Upon the addition of potassium ferrocyanide however, as well as during neutralisation, the filtrate deposits a few floccules and the filtrate of the latter becomes somewhat cloudy with the addition tannin. After a prolonged exposure [to acid] the products of this transformation increase [in quantity] and finally, on dilution and treatment with ferrocyanide, there is hardly any deposit unless tannin is added. Sometimes the resulting solution is coloured purple.

Caustic alkali has a similar effect, whereby the nuclei are completely dissolved. Initially when acidified with excess hydrochloric acid or ether almost everything precipitates; now, however, the sediment is also easily soluble in even the weakest soda solution. From [these results] I conjecture—subject to further testing of course—that soluble and insoluble nuclein are not significantly different, but rather, may simply be modifications that can easily switch from one to the other. Here too, neutralisation of the filtrate gave rise to a turbidity as did treatment with blood-lye salt. But when exposed to moderately dilute sodium hydroxide for several days, the solution gave a precipitate that was almost completely soluble in 1/1000 hydrochloric acid and ether; tannin, however, produced a strong turbidity with the neutral filtrate. For me this is evidence that the aforementioned albumin-like reaction that occurs after a short duration is not related to the protein components in the mixture. Rather, albumin or syntonin-like substances seem to be formed in the intermediate steps of the conversion of nucleic material, which are usually grouped together as peptone-like substance after giving mostly negative reactions. In any given experiment, I have been unable to determine exactly which stage of the transformation I have obtained; under apparently similar conditions, I sometimes obtained different results. It goes without saying

genau vorausbestimmen können; unter anscheinend ähnlichen Umständen erhielt ich zuweilen verschiedene Resultate. Es versteht sich von selbst, dass erst die Elementaranalyse und genaue Untersuchung der gebildeten Produkte bestimmten Aufschluss geben wird, ob die paar Reactionen nicht täuschen. Kochender Eisessig löste weder das lösliche noch das unlösliche Nuclein, schien aber auch ganz allmählig eine Umwandlung ähnlicher Art zu bewirken. Reactionen mit Metallsalzen habe ich, da ich nur alkalische Lösungen von Nuclein kenne, nicht angestellt. - Dagegen habe ich die wesentlichsten Eigenthümlichkeiten der Elementarzusammensetzung frstzustellen versucht, soweit mein sehr spärliches Material reichte. Ich habe vorgezogen, vorläufig die Versuche über einige besonders prägnante Bestandtheile zu wiederholen, weil diess besser vorläufigen Aufschluss gibt, ob man es mit chemischen Individuen oder mit Gemengen zu thun hat, als eine einzige vollständige Elementaranalyse. Sobald es mir möglich ist, werde ich sodann meine Angaben vervollständigen. Die Substanz ist N haltig, S haltig, daneben aber sehr reich an Phosphor. Die alte Tradition von den phosphorhaltigen Eiweissstoffen hat also doch einen realen Hintergrund.

- I. gr. 0,1915 lösliches Nuclein gaben 1811 Pt. = 13,47 N.
Die Kerne waren nach der Isolation nicht mit Alkohol extrahirt. Die folgenden Versuche sind an ganzen, mit Alkohol heiss erschöpften Kernen gemacht.
- II. gr. 0,2278 gaben 0,2378 Pt. = 14,60 N. Etwas Platinchlorid hatte sich durch ein Versehen beim Eindampfen zersetzt.
- III. gr. 0,2545 gaben 0,2518 Pt. = 13,99 N.
- IV. gr. 0,1862 gaben 0,1840 Pt. = 13,97 % N.
- V. gr. 0,3882 gaben, mit Aetzkali und Salpeter verbrannt, SO_4Ba 0,0494 = 2,005 % S.
- VI. gr. 0,4611 gaben SO_4Ba 0,0598 = 1,78 % S.
- VII. gr. 0,2453 gaben SO_4Ba 0,0318 = 1,77 % S. [p. 458]
- VIII. gr. 0,3882 gaben $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ 0,0350 = 5,76 % P_2O_5
- IX. gr. 0,4611 gaben $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$ 0,0430 = 5,96 % P_2O_5

Die Analysen Nr. V. und VIII., sowie VI. und IX. sind je an einer und derselben Portion Substanz angestellt; die beiden Portionen aber stammen von verschiedenen Darstellungen her. Die Bestimmungen geschahen nach Will und Varrentrapp, die Verbrennungen mit Ausnahme von V. (resp. VIII.) mit Soda und Salpeter.

Ich glaube, aus den gegebenen Analysen, so unvollständig sie sind, lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass wir es nicht mit einem beliebigen

that only an elementary analysis and precise examination of the products formed will provide certain information as to whether the few reactions are misleading or not. Boiling glacial acetic acid did not dissolve either soluble or insoluble nuclein, but it too seemed to produce a transformation of a similar type. I have not tried reactions with metallic salts because I am only familiar with alkaline solutions of nuclein. On the other hand, as far as my very limited material allowed, I tried to establish its fundamental elemental composition. For the time being, I preferred to repeat experiments on some particularly suggestive components, because this approach gives better preliminary information about whether one is dealing with an individual chemical entity or a mixture, [than does] than a single complete elemental analysis. As soon as it is possible, I will present the complete details. Not only does the substance contain nitrogen and sulphur, but it is also very rich in phosphorus. The old tradition of [investigating] phosphorus-containing proteins, had therefore, a genuine basis.

- I. 0.1915 g soluble nuclein gave 1811^v Pt.^w = 13.47 [percent] nitrogen. The nuclei were not extracted with alcohol after they were isolated. The following experiments were, on the whole, carried out using nuclei depleted with hot alcohol.
- II. 0.2278g gave 0.2378 Pt. = 14.60 [percent] nitrogen. Some platinum chloride had decomposed due to accidental evaporation.
- III. 0.2545g gave 0.2518 Pt. = 13.39 [percent] nitrogen.
- IV. 0.1862g gave 0.1840 Pt. = 13.97 % nitrogen.
- V. 0.3882g when heated with caustic potash and nitric acid (saltpeter), gave 0.0494 barium sulphate = 2.005% sulphur.
- VI. 0.4611g gave 0.0598 barium sulphate = 1.78% sulphur.
- VII. 0.2453g gave 0.0318 barium sulphate = 1.77% sulphur.
- VIII. 0.3882g gave 0.0350 magnesium pyrophosphate = 5.76% phosphorus pentoxide.
- IX. 0.4611g gave 0.0430 magnesium pyrophosphate = 5.96% phosphorus pentoxide.

Analyses V and VIII, as well as VI and IX were each performed on the same fraction of substance, but both fractions came from the different preparations. Nitrogen was determined according to Will and Varrentrapp's method; and, with the exception of V (and VIII respectively), combustion was done with sodium carbonate and potassium nitrate.

I believe the reported analyses, however incomplete, [indicate] that we are not dealing with a random mixture [of substances], mostly accounted as small

Gemenge, sondern höchstens kleine Verunreinigungen abgerechnet, mit einem chemischen Individuum oder einem Gemisch von sehr nahe verwandten Körpern zu thun haben. Dafür spricht auch die annähernde Uebereinstimmung im N gehalt des löslichen Nucleins und der ganzen Kerne, trotz einer nicht unwesentlichen Abweichung in der Darstellung, welche den N gehalt niederdrücken musste. - Auf Grund bloss qualitativer Versuche würde man an eine Verbindung von Lecithin mit einem Eiweissstoff oder Eiweissabkömmling denken, etwa wie man sich das Vitellin oder Ichthin vorgestellt hat. Aber 5,8 % PO_5 und 14 % N in einer und derselben Substanz lassen sofort diese Annahme dahinfallen. Wir haben vielmehr hier Körper sui generis, mit keiner jetzt bekannten Gruppe vergleichbar. Etwaige vielleicht berechtigte Zweifel an der vollkommenen Reinheit meines Präparats ändern an dieser Thatsache nichts. Dass der Phosphor wirklich an die organische Substanz gebunden ist, davon habe ich mich an zwei Versuchen überzeugt, der eine an 0,28, der andere an 0,38 gr. trockener Substanz angestellt. Die Substanz wurde im Porzellanschälchen erhitzt; dabei entwichen stark alkalische Dämpfe und es blieb eine aufgeblähte poröse schlackige, schwer verbrennliche Kohle zurück. Sobald die Entwicklung von Dämpfen aufgehört hatte, bevor die Kohle irgendwie ins Glühen kam, wurde mit dem Erhitzen aufgehört, die Kohle fein gepulvert und mit Wasser ausgekocht. Im ersten Falle reagirte das Wasserextract der Kohle neutral, hinterliess beim Verdunsten eine ganz geringe Spur von Rückstand, der aber in Wasser aufgenommen, kaum spurenweise Phosphorsäurereactionen gab. Die vollends Yerbrannte Kohle hinterliess ein paar Körnchen anorganischer Substanz, die in Salzsäure aufgenommen, mit Ammoniak übersättigt, wenige nach Eisenoxyd aussehende Flocken gab, die ich für zufällige Verunreinigungen halte. Phosphorsäure war in der salzsauren Lösung nicht nachzuweisen. Beim zweiten Versuch reagirte das Wasserextract der Kohle sauer und hinterliess einen geringen durchsichtigen Beschlag als Rückstand. Die ausgewaschene verbrannte Kohle hinterliess keinen Rückstand, die salz- [p. 459] saure Spülflüssigkeit der Platinschale gab keine Phosphorsäurereaction. Die im Wasserextract der Kohle vorgenommene Phosphorsäurebestimmung ergab aber blos 1,7 % der trockenen Substanz. Also auch hier war der grösste Theil des Phosphors verflüchtigt. Die Zurückführung des Phosphors auf Aschenbestandtheile ist also ausgeschlossen. Bei der eingeschlagenen Behandlung kann wohl an eine Reduction der Phosphorsäure durch die Kohle nicht gedacht werden. Es muss also hier der Phosphor in einer andern Weise als im Lecithin (im unoxydirten Zustande?) gebunden sein. Die Abweichungen der beiden Versuche können von verschieden raschem Erhitzen herrühren.

Nach Versuchen an anderweitigen Geweben, Über die ich binnen

contaminants, but rather with a specific chemical entity or a mixture of closely related entities. This idea is also supported by the approximate correspondence between the nitrogen content of the soluble nuclein and the whole nuclei, despite a not insignificant difference in the methods of preparation, which must have diminished the nitrogen content. On the basis of qualitative experiments alone, one might think that [this material] is a combination of lecithin with protein or protein-derivatives, somewhat like vitellin or ichthin.^x But [the presence of] 5.8% phosphoric acid and 14% nitrogen in the selfsame substance immediately refutes this supposition. Rather, we have here an entity that is in a class of its own and does not resemble any currently known group [of chemical substances of the cell]. Any doubts, however justifiable, about the purity of my preparations do not alter this fact. What convinced me that the phosphorus is actually bound to the organic substance, were two experiments: one using 0.28g of dry material, the other using 0.38g. [When] the substance was heated in a porcelain dish it gave off strongly alkaline vapours, leaving behind a swollen, coarse, porous, heavily combustible charcoal. Once the production of fumes had stopped, [but] before the charcoal glowed red-hot, it was removed from the heat, finely powdered, and boiled with water. In the first case, the aqueous extract gave a neutral reaction, and upon evaporation left a very slight trace of residue, which on absorbing water, however, hardly showed any indication of reaction for phosphoric acid. On complete combustion, the charcoal left a few granules of an inorganic substance, which on absorption of hydrochloric acid supersaturated with ammonia, gave a small number of floccules with the appearance of iron oxide, which I took to be an accidental impurity. Phosphoric acid was not detectable in the hydrochloric acid solution. In the second experiment, the aqueous extract of the charcoal gave an acidic reaction and left behind traces of a transparent film as a residue. The eluted combusted charcoal left no residue, and the hydrochloric acid used to wash the platinum bowl gave no reaction for phosphoric acid. However, a phosphoric acid assay on aqueous extract of the charcoal ash gave only 1.7% [when compared to] the dry substance. Here too, the greatest proportion of the phosphorus had evaporated. That the phosphorus had been recycled into the constituents of the ash is therefore ruled out. It is not possible to imagine that this method [could cause] a reduction in the phosphoric acid of the charcoal. Here, the phosphorus must therefore be bound in a different way than [it is] in lecithin (in the unoxidised state?). The deviations in the two experiments may be the result of heating at different rates.

After experiments on other tissues, which I shall report on shortly, it

Kurzem berichten werde, ist es mir nun wahrscheinlich, dass eine ganze Familie von solchen, unter einander etwas abweichenden phosphorhaltigen Körpern auftauchen wird, die vielleicht als Gruppe der Nucleinkörper den Eiweisskörpern ebenbürtig gegenübergestellt zu werden verdienen.

Ich kann mich dem Gedanken nicht verschliessen, dass hier sich die wesentlichste physiologische Leistung des Phosphors in den Organismen enthüllt. Ich denke dabei namentlich an die bekannte merkwürdige Thatsache, dass der Phosphor in den Pflanzen immer vorzugsweise oder fast ausschliesslich an der Wachstumsgrenze sich anhäuft; ist ja doch das Auftreten der Kerne hier wesentlich auf die wachsenden Theile, auf die in Vermehrung begriffenen Zellen beschränkt. Die Beziehungen der Kernstoffe zum Lecithin werden zuerst unsere Aufmerksamkeit fesseln; der erste Gedanke wird sein, dass das Nuclein, als den Eiweissstoffen näher stehend, die Muttersubstanz des Lecithins sei. Es fallen hier uameutlich zwei Möglichkeiten ins Auge. Entweder entsteht das ganze Lecithin aus dem Nuclein; dann müsste sich eine sehr stickstoffreiche Atomgruppe abspalten. Oder es geht eine einfachere phosphorhaltige Atomgruppe Verbindung ein mit Umsatzprodukten des Protoplasmaeiweisses; dann können daneben Albuminkörper oder allmminoide Gewebshildner entstehen. - Doch wozu Möglichkeiten erörtern? Es sind Fragen, die einer directen Bearbeitung von verschiedeucn Seiten her zugänglich sind. Die Untersuchung von Zellen in ihren Entwicklungsstadien gibt gewiss gute Anhaltspunkte über die genetischen Beziehungen beider Körper zu einander. Im Eiter gibt der constantc Gesamtposphorgehalt eine gute Basis für eine derartige Untersuchung. Die quantitative Bestimmung der Kernsubstanzen wird gewiss ziemlich gut gelingen, obwohl Spureu davon in Alkohol löslich sind (durch Wasser fällbar), auf Grund der angegebenen Methode. Ich will nur einen Versuch anführen. Man wird sich erinnern [p. 460] an die oben angeführte Bestimmung des Phosphors im Alkoholextract. Der Alkoholrückstand dieser Portion wurde in noch nicht völlig lufttrockenem Zustande in zwei abgewogene Portionen getheilt, die eine diente zur P bestimmung und zugleich durch ihre Gewichtsabnahme bei 100° zur Berechnung der Gesamttrockeustanz. Die andere Portion wurde ungetrocknet verdaut. Auf 100 Theile trockenen (mit Correction berechneten) in Alkohol unlöslichen Rückstand ergaben sich 6,057 % Theile unverdauliche Substanz - auf rlie gesamten trockenen Eiterzellen berechnet = 3,646 %. Berechne ich nun für diese Menge Kernsubstanz den gefundenen P_2O_5 gehalt des Nucleins, so erhalte ich eine Phosphorsäuremenge, welche gerade hinreicht, um die durch das Lecithin und die Basen der Asche nach der angenommenen Voraussetzung nicht gebundene Phosphorsäure zu decken.

now seems to me likely that we will find an entire family of such phosphorus-containing bodies, varying slightly from one another, [and that this] group of nucleic bodies [might prove equal in importance to] the proteins.

I cannot ignore the thought that it is here that the essential physiological function of phosphorus in the organism is revealed. I am thinking, in particular, of the well-known remarkable fact that phosphorus in the plants always accumulates preferentially, almost exclusively, at the boundary of growth. After all, the appearance of the nuclei here is essentially limited to regions of growth, in cells that are multiplying. The first thing that captures attention is the relationship of the nuclear material to lecithin; the initial thought is that nuclein, rather than [cellular] protein, is the source of the lecithins. Two possibilities stare one in the face here. Either all the lecithin originates from nuclein; in which case, a very nitrogen-rich atomic group would have to split off. Alternatively, there is a simpler combination of phosphorus-containing atoms with the metabolic products of protoplasmic protein, from which albumin bodies or the progenitors of albuminoid tissue might form. But why discuss possibilities? These are questions that are amenable to approaching directly from various angles. The study of cells in their developmental stages certainly gives good clues about the genetic relationships^x of the two entities to each other. The constant total phosphorus content of pus provides a good basis for such an investigation. The quantitative determination of nuclear substances would certainly work quite well [with] the specified method, even though traces are soluble in alcohol (water-precipitable). I will cite just one experiment. One is reminded of the aforementioned assay of phosphorus in alcoholic extract. The alcoholic residue of this fraction was divided into two weighed portions and incompletely dried in air; one of these portions served for the determination of phosphorus and, at the same time, through its weight loss at 100°C, to calculate the total amount of dry substance. The other was digested while still wet. For every 100 parts of dry residue insoluble in alcohol (calculated by means of correcting for sulphur), there was 6.057% of the part of indigestible substance, calculated to be 3.646% of the total dry pus cells. If I now calculate the phosphorus pentoxide content of the nuclein in amount of nuclear substance found, I obtain a quantity of phosphoric acid which is just sufficient to account for the phosphoric acid not bound by the lecithin and the bases of the ash, according to the accepted hypothesis [regarding its chemical composition].

Die P_2O_5 der Kerne betrug 0,233 % durch die Basen der Asche + Lecithin ungedeckt hleiben 0,314 % oder 0,203 % je nachdem man den höchsten oder den niedrigen unter den 3 gefundenen Gesamt P_2O_5 werthen annimmt. Der Versuch controllirt zugleich in etwas die Richtigkeit der Analysen.

Soweit bin ich auf Grund des vorliegenden Materials gekommen. Es ist klar, dass, abgesehen von Elementaranalysen, eine Anzahl einfacher und naheliegender Versuche fehlen, von denen wesentliche Aufschlüsse über die Beziehungen der Nucleinkörper zn drn bis jetzt bekannten Gruppen zu erwarten sind. Ich selbst werdr, so bald es mir möglich sein wird, weitere Mittheilungen machen. Ich denke aber, dass die erhaltenen, wenn auch fragmentarischen Ergebnisse, bedeutsam genug sind, um auch Andere, namentlich die Chemiker von Fach, zur Untersuchung aufzufordern. Die Erkenntniss der Beziehungen zwischen Kernstoffen, Eiweissstoffen und ihren nächsten Umsatzprodukten wird allrnällig den Vorhang lüften helfen, der die innern Vorgänge des Zellenwachsthums noch so gänzlich verhüllt.

Die vorliegende Untersuchung ist, bis auf einige abschliessende Versuche, im Laboratorium von Herrn Prof. Hoppe-Seyler in Tübingen ausgeführt worden. Ihm verdanke ich rlie praktische Einführung in das Gebiet der physiologischen Chemie: seiner mannigfachen Anregungen, seines erfahrenen Rathes, seiner vielfachen freundlichen Unterstützung werde ich immer in aufrichtiger Dankbarkeit gedenken.

Basel, October, 1869.

The phosphorus pentoxide in the nuclei yielded 0.233% through the alkali in the ash, and the unaccounted lecithin remained at 0.314% or 0.203% depending on the highest or lowest values of the three totals of phosphorus pentoxide used. The [experimental conditions] somewhat constrains the accuracy of the analysis.

On the basis of the available material, this is as far I have been able to get [with my analyses]. It is clear that, with the exception of an elemental analysis, [I have been unable to perform] a number of simple and obvious experiments, from which one would expect significant information about the relationships of the nuclein-containing bodies to the already known groups [of cellular substances]. I will share my results as soon as possible. I think, however, that the results obtained so far, although incomplete, are of sufficient significance to inspire others, especially professional chemists, to investigate further. Understanding the relationships between nuclear materials, proteins, and their metabolic products will gradually help to lift the veil, which still so completely obscures the internal processes of cell growth.

Apart from a few final experiments, the present study was carried out in the laboratory of Prof. Dr. Hoppe-Seyler in Tübingen. I am indebted to him for the introduction to the practices [practical] of the field of physiological chemistry; I will always think of his constant encouragement, learned suggestions, and kind support with sincere gratitude.

Basel, October, 1869.

Translator Notes

^a Scientific term used by physiologists for denoting fluid material passing or 'transuding' out of cells and tissues. The specific pathological transudate in this case was pus.

^b The granulated tissue described by Miescher is a reference to the second stage in the healing of a wound, during which phase the injured tissue is rebuilt, following the initial stage, which is characterized by the gathering of different white blood cells to the site of the wound. The colour and condition of the wound are often indicators of how well it is healing. Healthy tissue in the second stage is granular, uneven in its texture and should be red in colour and not bleed easily. (<https://www.clinimed.co.uk/wound-care/wound-essentials/phases-of-wound-healing>).

^c Carlo L. Rovida (1844-1877) was an Italian physician who, between 1870 and 1876, published several studies on the nature of urinary casts, namely microscopic structures produced in the kidney and shed in the urine, usually when the person is suffering from certain diseases. Through microscopic examination of urine and histological examination, Rovida distinguished two main types of casts from the tubular cells of the kidneys: one yellowish in colour and waxy in consistency and the other colourless and hyaline or gelatinous. He showed that the latter was composed of a unique protein that has today been demonstrated to be Tamm-Horsfall glycoprotein, a protein which is produced by the cells of Henle's loop (G.B. Fogazzi and G. Testanera, 'The farsighted studies of the Italian Carlo L. Rovida (1844-1877) on the nature of urinary casts', *American Journal of Nephrology* 22(2-3):300-8, August 2002).

^d Transparent and amorphous.

^e Miescher referred to this substance as salpetersaurem Baryt in the original paper, the direct translation of which is, as used above "nitric barite." The compound was most likely a solution of barium nitrate.

^f Syntonin is a type of fibrin protein found in muscle tissue, produced by the action of acid on the muscle protein myosin.

^g The comparison to a true solution leads us to believe that Miescher is referring to a colloid-like state here.

^h This figure refers to the dilution of the acid, namely 1 part in 1000 parts water

ⁱ Reference to German physiologist Wilhelm Friedrich Kühne (1837-1900), who in 1877 would coin the term 'enzyme' (See 'Über das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente' [On the behaviour of various organized and so-called unformed ferments], *Verhandlungen des naturhistorisch-medicinischen Vereins zu Heidelberg. Neue Folge* [new series] 1: 190-193.); p. 190).

^j Protagon is a group of fatty substances rich in phosphorus and nitrogen, often found in brain tissue, and originally thought to be a single compound. Miescher was likely

using the latter sense of the term here (<https://www.lexico.com/definition/protagon>).

^k Miescher was likely referring specifically to phospholipid compound called phosphatidylcholine, now known to play important roles in cellular structure and metabolism. In Miescher's time the term, in its plural form, lecithins, was also used more broadly to denote a whole group of phospholipids (<https://www.britannica.com/science/lecithin>).

^l An intermediary product of the degradation of substances such as protagon and lecithin, likely deriving its name from the fact that it was first isolated from nervous (brain) tissue (<https://www.lexico.com/definition/neurine>).

^m Information on chemical names obtained from the website: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

ⁿ Reference to Konstantin Diakonov (1839-1868) a student of Hoppe-Seyler who worked on organic phosphorus compounds such as lecithin and proposed a chemical structure for it based on its degradation products. (See James Riddick Partington, *A History of Chemistry*, Macmillan International Higher Education, 1964, p. 485; Joseph Fruton, *Contrasts in Scientific Style: Research Groups in the Chemical and Biochemical Sciences*, American Philosophical Society, 1990, pp. 93, 310; and Albert Prescott-Matthew, 'The Life and Work of Felix Hoppe-Seyler' *Popular Science Monthly*, Vol. 53, (1898): pp. 547-548).

^o Miescher used the term 'drusen', a geological term for encrustations of small crystals on surfaces of rocks.

^p Oskar Liebreich (1839-1908) was a German physiological chemist, and a predecessor to Miescher in Hoppe-Seyler's laboratory. In 1865 he had isolated a phosphorus-containing organic substance from the brain, which he named "protagon" (meaning leader) and made controversial claims for its importance (Oskar Liebreich, 'Ueber die Chemische Beschaffenheit der Gehirnssubstanz,' [On the chemical condition of the Brain Substance], *Annal. Chem. Pharm.* 134 (1865): 29-44). A more detailed account of this episode may be found in Theodore L. Sourkes, 'The protagon phoenix,' *Journal of the History of the Neurosciences* 4 (1995): 37-62.

^q Phosphate soda is a mixture of phosphate salts such as sodium phosphate in a dilute phosphoric acid.

^r In the xanthoproteic reaction, the presence of protein in a solution is detected by the addition of nitric acid followed by neutralization with an alkali. The acid converts amino acids such as tyrosine and tryptophan to xanthoproteic acid which turns dark yellow colour when neutralised with alkali, thus indicating the presence of protein.

^s Reference to E. Eichwald who in 1865 was the first person to show that the gelatinous substances called mucins--found in the epithelia of many organs where they form a protective barrier between the tissue and the external environment (better known today as glycoproteins--were composed of protein and sugar. (See JoséA Cabezas, 'The origins of glycobiology,' *Biochemical Education* 22, (1994): 3-7).

^t We believe he is referring here to potassium ferrocyanide (<https://glossary.wein-plus.eu/ferrocyanide>)

^u We believe this figure is in error and that the decimal notation was inadvertently omitted and that the measurement should have been 0.1811 g, which is consistent with

and in proportion to the other measurements.

^v Based on the context our best possible interpretation of the abbreviation Pt. is precipitate (Precipitat in German) as the modern usage of Pt as the symbol for platinum does not seem likely, give that platinum is not part of the chemical makeup of cellular material.

^w Vitellin is a lecithin containing found in the yolks of birds' eggs and ichthin is a similar substance found in the egg yolk of cartilaginous fish.

^x It should be noted that the author's use of the term 'genetic' here is not the sense in which it is most commonly used today, namely in the sense of something being hereditary or passed down the generations via the genes. Rather he seems to have used the term in a now less-commonly recognized sense of word as 'generative', that is, giving rise to or relating to or influenced by 'geneses or origins' (URL: <https://www.dictionary.com/browse/genetic?s=t>, accessed 8 July, 2020).

