

Zur Chemie der Leucocyten¹⁾.

Von

Leon Lilienfeld.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 23. September 1893.)

Eine eingehende Untersuchung über die Zusammensetzung der Leucocyten fehlt bis jetzt und die spärlichen Kenntnisse, welche wir darüber besitzen, wurden theils durch Analogieschlüsse, zu welchen die Untersuchungen Hoppe-Seyler's²⁾ über die Eiterzellen berechtigen, theils durch vereinzelte mikrochemische Beobachtungen erworben.

Hoppe-Seyler³⁾ hat auch Glykogen in den Leucocyten nachgewiesen, indem er Rindslinsen in die Bauchhöhle eines Hundes einführte und in dem mit eingewanderten Leucocyten durchsetzten Gewebe einen grossen Glykogenreichthum fand.

Schliesslich hat A. Kossel⁴⁾ die Zusammensetzung des leukämischen Blutes für eine wichtige Schlussfolgerung in dieser Frage verwerthet; indem er im leukämischen Blute mehr als die Hälfte der gesammten Phosphorsäure als an Eiweiss gebunden erkannte und darin auch die Nucleinbasen auffand, bewies er auf indirectem Wege, dass die Leucocyten Substanzen aus der Gruppe der Nucleoproteide enthalten müssen.

Die Chemie der Leucocyten ist bis vor Kurzem blos an Material studirt worden, welches aus eiskaltem filtrirtem Pferdeblutplasma nach Alexander Schmidt's Methode

¹⁾ Vorläufige Mittheilungen: Leon Lilienfeld: Ueber Leucocyten und Blutgerinnung. Derselbe: Ueber den flüssigen Zustand des Blutes und die Blutgerinnung. Verhandlungen der physiologischen Gesellschaft zu Berlin vom 8. April und 22. Juli 1892.

²⁾ Hoppe-Seyler, Med.-chem. Untersuch., Berlin 1870.

³⁾ Hoppe-Seyler, Med.-chem. Untersuch., S. 441. Berlin 1871.

⁴⁾ Kossel, diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 7.

dargestellt worden ist. Abgesehen von der grossen Schwierigkeit in der Beschaffung derartigen Ausgangsmaterials krankt diese Methode an dem ausserordentlich grossen Fehler, dass durch die Verdünnung des Plasmas mit dem 60- bis 80fachen Volumen Wassers der grösste Theil der in Wasser löslichen Substanzen, die, wie ich zeigen werde, die Hauptmasse der Leucocyten ausmachen, verloren geht.

Um über die eigentlichen primären gewebbildenden Substanzen der Leucocyten zu einiger Orientirung zu gelangen, habe ich mir die Aufgabe gestellt, die Lymphocyten aus Lymphdrüsen und der Thymusdrüse in möglichst grosser Reinheit zu isoliren. Zu diesem Zwecke wurden die aus dem Schlachthause kommenden Drüsen von den Blutgefässen und dem anhängenden Fett sorgfältig befreit, in kleine Stücke geschnitten und in Colirtücher aus grobmaschigem festen Hanf geschlagen, nachher wurden die ganzen Massen in einer Presse stark gepresst und der abfliessende Saft centrifugirt. Hierbei muss sorgfältig die Gegenwart von Wasser vermieden werden. Der Saft, welcher sich mikroskopisch als ein farbloses Serum mit darin suspendirten vollständig gut erhaltenen Lymphocyten darstellt, wird durch die Centrifuge in eine weisse Bodenschicht und eine darüber stehende Flüssigkeit zerlegt. Die Flüssigkeit wird abgegossen und, nachdem das Mikroskop gelehrt, dass der Bodensatz nur aus Lymphocyten besteht, derselbe in Arbeit genommen.

Die Lymphocyten der Thymusdrüse des Kalbes sind meistens einkernige Zellen, in denen die Masse des Kerns diejenige des Cytoplasmas überragt. Unter dem Mikroskop sind sie ganz rund, gar nicht gequollen, bei Verarbeitung von frischen Drüsen ohne eine Spur von Zerfall.

a) Die Eiweisskörper des Cytoplasmas.

Im Wasserextract der Leucocyten lassen sich zwei Eiweisskörper nachweisen:

1. Ein Eiweissstoff, der bei der Temperatur von 73 bis 75 Grad C. gerinnt;
2. ein bei 48 Grad coagulirender Eiweissstoff.

Ausserdem kann man aus dem Cytoplasma auch ein Nucleoproteid gewinnen, indem man die Leucocyten mit einer 10proc. Kochsalzlösung extrahirt und das Kochsalzextract mit Wasser fällt¹⁾. Dieses Nucleoproteid ist in seinen Eigenschaften dem Ichthulin²⁾ sehr ähnlich, es ist löslich in verdünnten Säuren und Alkalien, unlöslich in Wasser. Löst man diese Substanz, frisch gefällt, in 0,1—0,3proc. Salzsäure und unterwirft sie der Einwirkung künstlichen Magensaftes bei Körpertemperatur, so entsteht ein Niederschlag, welcher in verdünnten Säuren unlöslich, in caustischen und kohlen-sauren Alkalien leicht löslich ist. Mit Soda und Salpeter verascht gibt er reichliche Phosphorreaction. Darnach ist die Auffassung dieser Substanz als Nucleoproteid gerechtfertigt.

Nach Erschöpfung des ursprünglichen Nucleoproteids mit warmem Alkohol, kaltem absolutem Alkohol und Aether wurde diese Substanz im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet, nachher bei 110 Grad zur Gewichtconstanz gebracht und einer Analyse unterzogen.

Folgende Werthe resultirten:

C- und H-Bestimmung:

0,2371 gr. Substanz gaben 0,4648 gr. CO_2 = **53,46** % C.

0,1632 gr. H_2O = **7,64** % H.

N-Bestimmung (nach Kjeldahl):

0,2575 gr. trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 28,65 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = **15,57** % N.

P-Bestimmung:

3,2744 gr. trockene Substanz gaben 0,0512 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **0,433** % P.

b) Das Alkoholextract.

Kocht man die Leucocyten längere Zeit mit 50proc. Alkohol, so gehen ziemlich bedeutende Mengen von Bestandtheilen in Lösung über. Der Alkohol färbt sich braun. Filtrirt man nun ab und lässt das Filtrat eine Nacht lang in der Kälte stehen, so scheiden sich ziemlich grosse Mengen

¹⁾ Halliburton: Lehrbuch der chemischen Physiologie und Pathologie, Heidelberg 1893, S. 274.

²⁾ Siehe Walter: Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 335.

einer krystallinischen Substanz ab. Durch mehrfaches Umkrystallisiren aus warmem Alkohol gereinigt erwies sich diese Substanz als Protagon. Wenn man nämlich diese Substanz — nach der Methode von Kossel und Freytag¹⁾ — in Methylalkohol löst und die Lösung auf dem Wasserbade mit einer Lösung von Baryumhydrat in Methylalkohol versetzt, so bildet sich ein voluminöser Niederschlag. Derselbe wird mit barythaltigem Methylalkohol ausgewaschen, in Wasser fein zertheilt und mit einem Strom von Kohlensäure längere Zeit behandelt. Der nun entstehende Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt und sodann bei 50 Grad mit absolutem Alkohol ausgezogen. Aus dem Alkohol krystallisiren nun bei Zimmertemperatur die für das Protagon charakteristischen Cerebroside aus. Sie stellen ein weisses krystallinisches Pulver vor, welches mit verdünnter Schwefelsäure erhitzt eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung reducirende Zuckerart (Galactose) liefert. Ob hierbei ein oder mehrere Cerebroside entstehen, habe ich nicht näher untersucht. Da ich nun ausserdem eine Phosphorbestimmung in der ursprünglichen Substanz ausführte und die Zahl 1,13 fand, fühle ich mich berechtigt, diese Substanz mit Sicherheit als Protagon anzusprechen.

Der nach dem Abfiltriren des Protagons bleibende Alkohol wurde nun auf ein kleines Volumen abdestillirt und dann auf dem Wasserbade bis zur syrupösen Consistenz eingeeengt, der Syrup in heisses Wasser gegossen, hierbei geht eine grosse Menge der Bestandtheile in Lösung. Wenn man nun die wässerige Lösung, nachdem sie von den schleimigen ungelösten Bestandtheilen abfiltrirt worden ist, eindunstet, so bekommt man schliesslich einen Syrup, der beim Erkalten zu einer festen Krystallmasse erstarrt. Kocht man diese längere Zeit mit absolutem Alkohol aus, filtrirt ab und lässt den Alkohol erkalten, so krystallisirt aus demselben in schönen atlasglänzenden Blättchen eine Substanz aus, welche sich nach mehrfachem Umkrystallisiren aus 90 proc. Alkohol als Amidovaleriansäure erwies.

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XVII, S. 440.

Die Analyse ergab:

1. 0,1817 gr. Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,3454 \text{ gr. CO}_2, \\ 0,1583 \text{ gr. H}_2\text{O}. \end{array} \right.$
2. 0,1879 gr. Substanz verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 15,1 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für die Formel

$\text{C}_5 \text{H}_{11} \text{NO}_2$:	Gefunden:
C = 51,28 %.	C = 51,84 %.
H = 9,40 %.	H = 9,68 %.
N = 11,96 %.	N = 11,2 %.

Das Präparat war nicht ganz rein, was die nicht ganz genaue Uebereinstimmung des gefundenen Stickstoffprocentgehaltes mit dem berechneten zur Folge hatte.

Der mit Alkohol erschöpfte Rückstand wird nun wieder im Wasser gelöst und mit basisch essigsaurem Blei gefällt. Der voluminöse Bleiniederschlag wird auf einem Filter gesammelt und mehrere Male mit Wasser ausgewaschen, nachher in Wasser fein vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelblei abfiltrirte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen gebracht und mit heissem Alkohol bis zur schwachen Trübung versetzt. Nach längerem Stehen scheidet sich eine grosse Menge schön ausgebildeter Krystalle aus. Die Krystallmasse durch mehrfaches Umkrystallisiren aus wässrigem Alkohol gereinigt, schmilzt bei 225 Grad und erstarrt beim Erkalten zu feinen Nadeln. Die ausgeführte Elementaranalyse ergab Zahlen, welche die Identität des Körpers mit Inosit sicherstellten.

C- und H-Bestimmung.

- 0,2653 gr. Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,3887 \text{ gr. CO}_2 = 39,96 \% \text{ C.} \\ 0,1653 \text{ gr. H}_2\text{O} = 6,92 \% \text{ H.} \end{array} \right.$

Berechnet für	Gefunden:
$\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$:	
40,00 % C.	39,96 % C.
6,66 % H.	6,92 % H.

Das auf diese Weise erhaltene Inosit ist krystallwasserfrei und gibt die Scherer'sche und Seidel'sche Reaction.

Ausser Protagon und Inosit gelang es mir, auch noch im Alkoholextract der Leucocyten Monokaliumphosphat nachzuweisen, worauf ich in einer anderen Abhandlung zurückzukommen gedenke.

Dass in dem Alkoholextract auch Lecithin und Cholesterin vorhanden sind, ergibt sich aus der später folgenden quantitativen Analyse der Leucocyten.

c) Der Zellkern der Leucocyten und das Nucleohiston.

Schüttelt man die Leucocyten oder die ganz fein zerhackten Thymusdrüsen mit Wasser, so geht ein Körper in Lösung, welcher die Hauptmasse des Leucocytenkernes ausmacht. Es ist dies das schon früher von mir¹⁾ beschriebene Nucleohiston; dasselbe wird folgendermaassen dargestellt. Das Wasserextract der Leucocyten oder der ganzen Drüsen wird colirt und die Flüssigkeit centrifugirt. Von dem hierbei entstehenden kleinen Bodensatz wird die Flüssigkeit abgossen und filtrirt. Aus dem nun resultirenden, von zelligen Elementen völlig freien Wasserextract wird das Nucleohiston mit Essigsäure ausgefällt, auf einem Filter gesammelt, mit Wasser fein zerrieben, durch Zusatz von ein wenig Natriumcarbonat bis zur ganz schwach alkalischen Reaction gelöst, filtrirt und durch Essigsäure wieder gefällt. Nochmals durch Lösen und Fällen in derselben Weise gereinigt wird der Körper für die Elementaranalyse mit essigsäurehaltigem Wasser, Weingeist, kaltem absolutem Alkohol behandelt, welcher mit heissem absolutem Alkohol drei- bis viermal am Rückflusskühler ausgekocht und schliesslich mit Aether vollends erschöpft. Die ganz weisse Masse wurde mit dem Spatel in kleine Stücke zerbröckelt und unter der Luftpumpe getrocknet. Nach Abdunsten des Aethers stellt das Nucleohiston ein schneeweisses, äusserst zartes Pulver dar, welches sich bei 110 bis 115 Grad leicht bis zur Gewichtsconstanz trocknen lässt.

Die Eigenschaften des Nucleohistons sind folgende. Es ist unlöslich in Benzol, Alkohol, Chloroform, Methylalkohol und Aether, unlöslich in Essigsäure, dagegen löslich in Eisessig, concentrirter Salz- und Salpetersäure. Es ist ferner löslich in Natroncarbonat, Natriumhydrat, Ammoniak und frisch gefällt in Kochsalz und Magnesiumsulphat, besonders bei Gegenwart

¹⁾ Leon Lillienfeld: Ueber Leucocyten und Blutgerinnung; derselbe: Ueber den flüssigen Zustand und die Blutgerinnung. Verhandlungen der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin vom 8. April und 22. Juli 1892.

von etwas Essigsäure. Aus der neutralen Lösung des Nucleohistons fällt es durch Essigsäure, Mineralsäure (im Ueberschuss löslich), Alkohol, Platinchlorid, Silbernitrat, Quecksilberchlorid. Durch Sättigung mit $MgSO_4$ ist es nicht fällbar. Die Elementaranalyse des Nucleohistons ergab:

C- und H-Bestimmung:

Präparat 1.

0,2242 gr. trockene Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,3969 \text{ gr. } CO_2 = 48,28\% \text{ C.} \\ 0,1454 \text{ gr. } H_2O = 7,21\% \text{ H.} \end{array} \right.$

Präparat 2.

a) 0,2012 gr. trockene Substanz gaben 0,3549 gr. $CO_2 = 48,11\% \text{ C}$ (die Wasserstoffbestimmung ist verunglückt).

b) 0,2468 gr. trockene Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,4360 \text{ gr. } CO_2 = 48,18\% \text{ C.} \\ 0,1532 \text{ gr. } H_2O = 6,89\% \text{ H.} \end{array} \right.$

Präparat 3.

a) 0,2468 gr. trockene Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,4417 \text{ gr. } CO_2 = 48,77\% \text{ C.} \\ 0,1524 \text{ gr. } H_2O = 6,86\% \text{ H.} \end{array} \right.$

b) 0,1938 gr. trockene Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,3448 \text{ gr. } CO_2 = 48,54\% \text{ C.} \\ 0,1195 \text{ gr. } H_2O = 6,85\% \text{ H.} \end{array} \right.$

Präparat 4.

0,2239 gr. trockene Substanz gaben $\left\{ \begin{array}{l} 0,4021 \text{ gr. } CO_2 = 48,98\% \text{ C.} \\ 0,1450 \text{ gr. } H_2O = 7,19\% \text{ H.} \end{array} \right.$

N-Bestimmungen:

Präparat 1.

a) Nach Dumas: 0,2647 gr. trockene Substanz gaben bei Bar. 740 mm., t. 17,90, Vol. = 40 ccm. = $16,99\% \text{ N}$.

b) Nach Kjeldahl: 0,2357 gr. trockene Substanz wurden mit conc. Schwefelsäure und Permanganat verascht. Zur Neutralisation des alkalischen Destillats wurden verbraucht 28,23 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = $16,77\% \text{ N}$.

c) Nach Kjeldahl: 0,2525 gr. trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 30,45 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = $16,88\% \text{ N}$.

Präparat 2 (nach Kjeldahl).

a) 0,3355 gr. trockene Substanz verbrauchten 40,6 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = $16,94\% \text{ N}$.

b) 0,2596 gr. trockene Substanz verbrauchten 31,18 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = $16,82\% \text{ N}$.

c) 0,2763 gr. trockene Substanz verbrauchten 33,2 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = $16,82\% \text{ N}$.

Präparat 3.

0,3005 gr. trockene Substanz verbrauchten 36,15 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = $16,84\% \text{ N}$.

Präparat 4 (nach Kjeldahl).

- a) 0,3213 gr. trockene Substanz verbrauchten 38,9 cbcm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = **16,95** % H.
 b) 0,2761 gr. trockene Substanz verbrauchten 33,1 cbcm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = **16,78** % N.

Die Veraschung grösserer Substanzmengen zum Zwecke der Bestimmungen von Schwefel und Phosphor wurde in der Weise ausgeführt, dass die Substanz mit Soda und Salpeter vollständig verbrannt wurde.

P-Bestimmungen:

Präparat 1.

- a) 0,4165 gr. trockene Substanz gaben 0,0465 gr. Magnesiumpyrophosphat = **3,02** % P.
 b) 0,5245 gr. trockene Substanz gaben 0,0580 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,088** % P.

Präparat 2.

- a) 0,3765 gr. trockene Substanz gaben 0,0407 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,02** % P.
 b) 0,4845 gr. trockene Substanz gaben 0,0516 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **2,974** % P.

Präparat 3.

- a) 0,4846 gr. trockene Substanz gaben 0,0521 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,00** % P.
 b) 0,4983 gr. trockene Substanz gaben 0,0548 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,071** % P.

Präparat 4.

0,6132 gr. trockene Substanz gaben 0,0659 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,00** % P.

S-Bestimmungen:

Präparat 1.

0,2713 gr. trockene Substanz mit Soda und Salpeter verascht, Schmelze in Wasser gelöst, mit Salzsäure bis zur sauren Reaction versetzt und mit überschüssiger Salzsäure dreimal zur Trockne verdunstet 14,4 mgr. Baryumsulfat = **0,752** % Schwefel.

Präparat 2.

0,3963 gr. trockene Substanz gaben 0,0188 gr. $BaSO_4$ = **0,653** % Schwefel.

Im Mittel resultiren diese Zahlen:

$$\begin{aligned} C &= 48,46 \% \\ H &= 7,00 \% \\ N &= 16,86 \% \\ P &= 3,025 \% \\ S &= 0,701 \% \end{aligned}$$

Diese ausserordentlich gut übereinstimmenden Elementaranalysenzahlen einerseits und andererseits der Umstand, dass das erste Präparat, trotzdem es durch Lösen in Natroncarbonat und nachheriges Fällen nicht gereinigt wurde, in seiner Elementarzusammensetzung gut mit den anderen über-

einstimmt, liefern den werthvollen Beweis, dass das Nucleohiston ein chemisches Individuum ist.

Nach seinem Phosphorgehalt und seinen Löslichkeitsverhältnissen differirt das Nucleohiston sowohl von den bisher bekannten Nucleoalbuminen als von den Nucleinen, um so mehr als es als Spaltungsproduct ein typisches Nuclein liefert.

Behandelt man das Nucleohiston längere Zeit mit künstlichem Magensaft bei Körpertemperatur, so liefert es als Endproduct ein Nuclein, während Eiweisskörper als Peptone in Lösung gehen.

In diesem Nuclein wurde, nachdem es mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen wurde, der Phosphorgehalt bestimmt.

Präparat 1.

0,2510 gr. trockene Substanz mit Soda und Salpeter verascht, Schmelze in Wasser gelöst und mit HCl mehrere Male eingedunstet, dann mit Magnesiainmixtur versetzt, gaben 0,0446 gr. $Mg_2P_2O_7 = 4,988\%$ P.

Präparat 2.

0,2829 gr. trockene Substanz gaben, mit rauchender Salpetersäure nach Carius 5 Stunden auf 210 Grad erwärmt und nach dem Verdunsten der Salpetersäure in Wasser gelöst und mit Magnesiainmixtur gefällt, 0,0506 gr. $Mg_2P_2O_7 = 4,995\%$ P.

Im Mittel 4,991 % P.

Ein Nuclein mit demselben Phosphorgehalt bekommt man aus dem Nucleohiston durch Behandeln desselben mit 0,8proc. Salzsäure. Dann geht die eine Componente, das Histon, in Lösung, während das Nuclein ungelöst bleibt. Dieses Nuclein unterscheidet sich jedoch von dem mit der Verdauungsmethode erhaltenen durch seine Löslichkeit in überschüssiger Salzsäure.

Ein durch Salzsäure von Histon vollständig befreites Präparat wurde auf seinen Phosphorgehalt geprüft, es gaben 0,5268 gr. trockene Substanz 0,0887 gr. $Mg_2P_2O_7 = 4,702\%$ P.

Daraus ergibt sich, dass das durch die Verdauung und das durch Salzsäure erhaltene Nuclein sehr nahe verwandte Präparate sind.

Ich will hier gleich bemerken, dass man aus dem Nucleohiston durch Behandlung desselben mit siedendem Wasser noch ein Nuclein bekommen kann, welches sowohl in Wasser als in wässerigem Alkohol und sogar in verdünnten Mineral-

säuren leicht löslich ist. Auf dieses Nuclein will ich ein andermal zurückkommen.

Aus dem Nucleohiston lässt sich auch Nucleinsäure abspalten; aus einer grösseren Menge wurde nach einer mir von Herrn Professor Kossel gütigst zur Verfügung gestellten, demnächst zu publicirenden Methode eine grössere Menge Nucleinsäure dargestellt und zur Synopsis der Phosphorgehalt darin bestimmt.

0,4684 gr. trockene Substanz gaben 0,1617 gr. $Mg_2P_2O_7 = 9,94\%$ P.

Was ist nun neben dem Nuclein das zweite Spaltungsproduct des Nucleohistons?

Behandelt man das Nucleohiston mit verdünnter Salzsäure, so geht ein Körper in Lösung, welcher mit dem von Kossel¹⁾ in den Kernen der rothen Blutkörperchen der Gans entdeckten Histon identisch ist. Die für das Histon charakteristische Eigenschaft ist die Fällbarkeit mit Ammoniak in salzsäurer Lösung und Unlöslichkeit in überschüssigem Ammoniak. Der aus dem Nucleohiston der Leucocyten gewonnene Körper zeigt alle von Kossel beschriebene Eigenschaften. Mit Natronlauge und Kupfersulfat gibt er in der Kälte starke Biuretreaction. Die neutrale Lösung des Histons wurde gefällt durch Ammonsulfat, Chlorammonium, Magnesiumsulfat, Natroncarbonat, Ammoniak, Kalkwasser, Aetznatron. Durch Natriumphosphat, neutrales und basisches Bleiacetat, Essigsäure, Schwefelsäure, Calciumchlorid, Quecksilberchlorid ist die Lösung nicht fällbar. Zur Synopsis des Körpers wurde der Ammoniakniederschlag des Histons analysirt. Es ergaben sich folgende Zahlen:

Lilienfeld:		Kossel:	
C . . .	52,34 %	C . . .	52,31 %
H . . .	7,31 »	H . . .	7,20 »

Das Nucleohiston gibt mit Schwefelsäure längere Zeit erhitzt als Spaltungsproduct die Nucleinbasen, und zwar Adenin und Hypoxanthin. Es wurde der Stickstoff bestimmt, welcher in Form dieser zwei Basen gebunden ist. Zu diesem Zweck wurden 7,42 gr. wasserhaltiges Nucleohiston mit 200 cbem.

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie 1884.

Wasser und 6 chem. conc. H_2SO_4 zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt; dann wurde die gleiche Menge H_2SO_4 hinzugesetzt. Da das Kochen am Rückflusskühler durch starkes Schäumen der Reactionsflüssigkeit gehindert wird, wurde letztere noch sechs Stunden auf dem Wasserbade erhitzt. Nachher wurde abfiltrirt und der Niederschlag mit heissem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht, so dass die Lösung 20% Ammoniak enthält, mit ammoniakalischer Silberlösung in der Wärme gefällt, darauf mit ammoniakhaltigem und heissem Wasser ausgewaschen und der Niederschlag bei 100 Grad getrocknet. Die Wägung desselben ergab 1,281 gr. Silberverbindung der Basen.

N-Bestimmung.

0,2500 gr. verbrauchten 31,12 chem. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = 17,42% N.

Ag-Bestimmung.

0,5407 gr. gaben 0,3065 gr. AgCl = 24,66% Ag.

Die Beziehungen dieser Körper zu einander lassen sich demnach durch folgendes Schema versinnlichen:

Nucleohiston

in Wasser löslich zerfällt
bei Säurezusatz

in

Histon

Leuconuclein in
Säuren löslich.
Zerfällt bei der
Behandlung der
alkalisch-alkoho-
lischen Lösung

in

Eiweiss

Nucleinsäure zer-
fällt beim Er-
hitzen in Mineral-
säure

in

Phosphorsäure Nucleinbasen
(Adenin u. Hypo-
xanthin)

und unbekanntes Spaltungsproducte.

Das Histon ist ein Eiweisskörper, welcher ausgesprochen basische Eigenschaften hat, was daraus erhellt, dass er mit Salzsäure eine in Wasser leicht lösliche Verbindung eingeht. Das Histon der Leucocyten unterscheidet sich von dem der Vogelblutkörperchen darin, dass es in der Hitze coagulirbar ist; das in der Hitze entstehende Gerinnsel löst sich aber zum Unterschied von allen anderen Eiweissstoffen sehr leicht in Mineralsäuren auf. Ich kann hier nicht die Thatsache übergehen, dass das Histon in der physiologischen Chemie sehr vernachlässigt wurde und dass man den Einwand erhob, es sei das Histon vielleicht ein Kunstproduct der Salzsäure. Dieser Einwand ist vollkommen ungerechtfertigt; denn erstens ist an Gewinnung von Substanzen aus dem thierischen Organismus ohne chemische Reagentien nicht zu denken und zweitens ist das Histon als Base an eine verhältnissmässig starke Säure, das Nuclein, gebunden. Man muss daher die Verbindung mit einer Säure angreifen, um das Histon überhaupt zu erhalten.

Das Nucleohiston als Ganzes könnte man vielleicht als saures Salz auffassen. Aus der Lösung in Natriumhydrat fällt nämlich durch Alkohol die Natriumverbindung des Nucleohistons, welche in Wasser leicht löslich ist. In der wässerigen Lösung der letzteren fällt durch Baryumchlorid die Barytverbindung. Das Nucleohiston gibt Millon'sche Reaction, Xantoproteinreaction und schwache Biuretreaction nach längerem Stehen. Es zersetzt Wasserstoffsperoxyd, welche Eigenschaft nach der Behandlung mit Alkohol und Aether verloren geht.

d) Die quantitative Zusammensetzung der Leucocyten.

Auf Aufforderung des Herrn Professor Kossel führte ich auch eine Analyse der aus der Thymusdrüse isolirten Leucocyten aus. Meines Wissens ist das die erste Analyse einer normalen thierischen Zelle. Das Nucleohiston wurde so bestimmt, dass ich die Leucocyten 24 Stunden mit Wasser digerirte, nachher filtrirte und das Filtrat mit Essigsäure fällte. Der Niederschlag wurde gesammelt, mit kaltem und heissem Alkohol, schliesslich mit Aether gewaschen, bei 115 Grad bis zur Gewichtconstanz getrocknet und mitsammt dem

gewogenen Filter gewogen. Nachher wurde zur Feststellung der Reinheit der Phosphorgehalt bestimmt. Das Histon wurde als Ammoniakniederschlag, das Glykogen nach Brücke's Methode und die Nucleinbasen nach der früher erwähnten Methode bestimmt. Die anderen Substanzen bestimmte ich nach der in Hoppe-Seyler's Handbuch der Analyse angegebenen Methode.

Es ergaben sich im Mittel folgende Zahlen:

Trockensubstanz der Leucocyten im Durchschnitt: 11,49 %

Auf 100 Theile der Trockensubstanz fand ich:

Gesamtphosphorgehalt	3,01 %
Gesamtstickstoffgehalt	15,03 %
Eiweissstoffe	1,76
Leuconuclein	68,78
Histon	8,67
Lecithin	7,51
Fette	4,02
Cholesterin	4,40
Glykogen	0,80
Silberverbindung der Nucleinbasen	15,17

Geradezu frappant ist die ungeheure Menge von Nucleo-histon und die verschwindend kleine Menge der Eiweisskörper. Ich muss noch bemerken, dass mehrere Analysen gut übereinstimmende Zahlen ergaben. Zum Schluss sei es mir gestattet, dem Herrn Professor Kossel für seine gütige Unterstützung meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Nachtrag.

Analytische Belege zur quantitativen Zusammensetzung der Leucocyten.

1. Trockensubstanzbestimmungen.

- 10,741 gr. feuchten Leucocytenbreies hinterliess bei 110° zur Constanz getrocknet 1,0546 gr. Rückstand = 9,82 % Trockensubstanz.
- 6,0586 gr. feuchter Leucocyten hinterliessen bei 110° getrocknet 0,5634 gr. = 9,30 % Trockensubstanz.
- 9,5902 gr. hinterliessen 1,288 gr. Rückstand = 13,43 % Trockensubstanz.
- 8,6656 gr. hinterliessen 1,1544 gr. Rückstand = 13,32 % Trockensubstanz.

2) *Bestimmungen des Gesamtphosphorgehaltes.*

- a) 0,9405 gr. trockener Leucocyten gaben 0,1016 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 3,017\%$ P.
 b) 0,4722 gr. trockener Leucocyten gaben 0,052 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 3,075\%$ P.
 c) 0,7725 gr. trockener Leucocyten gaben 0,0814 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 2,94\%$ P.

3) *Bestimmungen des Gesamtstickstoffgehaltes.*

(Nach Kjeldahl.)

- a) 0,2270 gr. trockene Leucocyten verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 23,51 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = **14,86%** N.
 b) 0,2165 gr. trockene Leucocyten verbrauchten zur Neutralisation des Destillats 23,51 ccm. $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure = **15,20%** N.