

Ueber die Spaltungsprodukte des Histons von Leucocyten.

Von

Dr. D. Lawrow.

Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.

Der Redaction zugegangen am 31. Juli 1899.

Die Histone bilden eine Gruppe von Eiweisskörpern, welche trotz ihrer grossen Verbreitung und trotz ihres principiellen Interesses für die chemische Kenntniss der Eiweisskörper noch wenig erforscht sind. Eine scharfe Charakterisirung dieser Stoffe gegenüber anderen Eiweisskörpern ist im Wesentlichen von dem Studium ihrer Spaltungsprodukte zu erwarten. Dieses Studium muss uns Aufklärung darüber verschaffen, inwiefern den eigenthümlichen äusserlichen Merkmalen der Histone eine Besonderheit in ihrer Constitution entspricht. Abgesehen von einigen vorläufigen Angaben fehlen uns Untersuchungen in dieser Richtung. Zunächst wäre es lehrreich, diejenigen Spaltungsprodukte der Histone zu kennen, welche aus den einfachsten Eiweisskörpern, den Protaminen, in der grössten Menge hervorgehen — die Hexonbasen.¹⁾ Sollen doch nach den Angaben von A. Kossel diese bei den Histonen reichlicher vertreten sein, als bei den übrigen Eiweisssubstanzen.

Darum bin ich bereitwillig auf den Vorschlag des Herrn Prof. A. Kossel eingegangen, die Hexonbasen des Histons von Leucocyten zu untersuchen.

Hierfür benutzte ich das aus Thymusdrüsen nach A. Kossel's Methode dargestellte Histon. Die frischen, fein zer-

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 165—189.

hackten Thymusdrüsen wurden mit Wasser und Chloroform 24 Stunden bei Zimmertemperatur digerirt, sodann colirt und das Filtrat mit Essigsäure unter Vermeidung eines Ueberschusses gefällt. Der erhaltene Niederschlag des Nucleohistons wurde abgetrennt, abgepresst und mit verdünnter Salzsäure (0.8%o) in Gegenwart von Chloroform bei Zimmertemperatur etwa 12—16 Stunden extrahirt. Der abgetrennten Lösung wurde 95%iger Alkohol — 1/2 Volumen — und Ammoniak hinzugefügt, solange noch ein Niederschlag entstand. Der nach 2—3 Stunden abgesaugte Niederschlag wurde mit Filtrirpapier sorgfältig abgepresst und zuerst auf dem Wasserbade, endlich bei 100—105° ganz getrocknet.

Auf diese Weise habe ich aus etwa 28 kg Thymusdrüsen ungefähr 475 g bei 100—105° getrocknetes Histon dargestellt. Dieses Histon gab die Reaction von Adamkiewicz und färbte sich mit Millon's Reagens, doch schwächer, als z. B. das Eieralbumin. Beim Kochen mit starker Kalilauge und Bleiessig zeigte es gar keine schwarze Färbung.

Die Reinigung dieses Histons durch eine wiederholte Auflösung in verdünnter Schwefelsäure (oder Chlorwasserstoffsäure) und Fällung mit Ammoniak in Gegenwart von Alkohol stiess auf grosse Schwierigkeiten, weil es sich zeigte, dass die Löslichkeit des Histons in überschüssigem Ammoniak immer mehr zunahm.

Das getrocknete Histon wurde durch Kochen mit Salzsäure in Gegenwart von Zinn gespaltet. Auf je 100 g Substanz kamen 10 g Zinn und 650 ccm. (20%o) Salzsäure. Die Mischung wurde zuerst in einem Kolben mit Rückflusskühler auf kochendem Wasserbade bis zur Auflösung des Eiweisses erhitzt, darauf auf dem Sandbade 72 Stunden ununterbrochen gekocht. Der Rückflusskühler wurde mit einem langen Capillarföhrchen verschlossen. Die Lösung der Zersetzungsprodukte wurde nach der Entfernung des Zinns durch Schwefelwasserstoff mit Wasser auf das Fünffache verdünnt, durch Schwefelsäure angesäuert, so dass der Gehalt an derselben 5%o betrug, und durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der abgesaugte Niederschlag wurde dreimal mit 5%iger Schwefelsäure sorgfältig ausgewaschen und jedesmal abgepresst. Darauf wurde

er mit Wasser gemischt und bei 60—65° durch Barythydrat zerlegt. Der Niederschlag wurde zweimal mit heissem Wasser ausgewaschen und durch die vereinigten Filtrate Kohlensäure hindurchgeleitet. Der Gehalt der nach Abdampfen und Filtriren gewonnenen Lösung an organischen Substanzen betrug etwa 120,6 g; daneben waren 3,5 g anorganische Substanzen vorhanden. Aus dieser Lösung wurden die Hexonbasen nach der von A. Kossel angegebenen Methode isolirt.¹⁾ Der durch Silbernitrat und Baryt erhaltene sehr voluminöse Niederschlag, welcher Histidin und Arginin enthalten musste, wurde nach mehreren Stunden abgesaugt, dreimal mit Wasser ausgewaschen und mit sehr verdünnter Salpetersäure gelöst. Die filtrirte Lösung wurde abwechselnd mit Ammoniak und Silbernitrat versetzt, solange noch die Bildung eines Niederschlages stattfand. Der nach dieser von Hedin angegebenen Methode²⁾ erhaltene Niederschlag von Histidin wurde abgetrennt, mit Wasser ausgewaschen und durch sehr verdünnte Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wurde durch Schwefelwasserstoff von Silber und durch Barythydrat von Schwefelsäure befreit.

Aus dem Filtrate vom letztgenannten Histidinniederschlage wurde Silber durch Schwefelwasserstoff und eine kleine Menge vom Barythydrat durch Schwefelsäure entfernt.

Der Gehalt der Lösung des rohen Histidins an organischen Substanzen betrug 7,435 g, daneben waren 1,52 g anorganische Stoffe vorhanden.

Der Gehalt der Lösung des rohen Argininnitrats belief sich auf 126,725 g organische und 3,30 g anorganische Stoffe; derselbe der Lösung der anderen Spaltungsprodukte — Lysin-fraction — 46,84 g und 3,18 g.

Somit zeigte sich, dass das Histon der Leucocyten bei Zersetzung durch Chlorwasserstoffsäure alle drei Hexonbasen lieferte, und zwar betrug die Summe derselben ungefähr 25% seines Gewichtes. Der grössere Theil dieser Zersetzungsprodukte fällt auf das Arginin.

1) A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXV, 1. c.

2) S. G. Hedin, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 191—196.

Nach A. Kossel enthält das Histon ungefähr 40% Stickstoff in Form von Hexonbasen.¹⁾

Histidinfraktion.

Die nach obigem Verfahren dargestellte Lösung des rohen Histidins wurde durch Thierkohle entfärbt, auf dem Wasserbade eingedampft, mit concentrirter Chlorwasserstoffsäure gemischt, noch weiter bis zur beginnenden Krystallisation eingeeengt, abgekühlt und mit Alkohol und etwas Aether gemischt, solange noch ein krystallinischer Niederschlag entstand. Derselbe wurde abgesaugt und in gleicher Weise noch zweimal umkrystallisirt. Die Ausbeute betrug 2,6 g. Es zeigte sich, dass die Substanz Baryum enthielt.

0,1459 g der im Vacuumexsiccator getrockneten Subst.	gaben 0,1788 g AgCl
0,1101 " " " " "	" " " 0,135 " AgCl

Gefunden: HCl 31,18%.

Obwohl die Substanz noch einmal umkrystallisirt würde, blieb doch der Gehalt an Chlorwasserstoffsäure unverändert, auch wurde der Baryumgehalt durch Umkrystallisation nicht entfernt.

0,2917 g der im Vacuumexsiccator getrockneten Subst.	gaben 0,358 g AgCl .
--	-------------------------------

Gefunden: Berechnet für $(\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl})_2 \cdot \text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

HCl 31,24%	31,27%
---------------------	--------

Sowohl die Analyse des umkrystallisirten Produkts, wie auch die obige Chlorbestimmung in dem ursprünglichen Salz würden mit der Annahme eines Baryumdoppelsalzes wohl zu vereinigen sein.

Dieses Doppelsalz schmilzt bei 219—222° unter Zersetzung.

Nach den Beobachtungen von A. Kossel²⁾ ist das salzsaure Histidin optisch activ. Da diese Angabe nicht mit den Resultaten von Hedin übereinstimmt, ist die Möglichkeit, dass zwei Histidine existiren, in Betracht zu ziehen. Es ist daher von Interesse, das Drehungsvermögen des aus Histon darge-

1) Fr. Müller, Deutsch. med. Wochenschr., 1899, Nr. 13.

2) A. Kossel, Sitzungsberichte der Marburger Gesellschaft für die Förderung der gesammten Naturwissenschaften vom Juni 1899.

stellten Histidins festzustellen. Die Polarisationsuntersuchung der Substanz wurde mit einem grossen Lippich-Landolt'schen Halbschattenpolarimeter ausgeführt:

Das Resultat der Beobachtung ist folgendes:

$$l = 4 \text{ dm. } t = 20^\circ \text{ C., } p = 1.602, d = 1.0105, (\alpha) = + 0.43^\circ$$

$$(\alpha)_D^{20} \text{ für } C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HCl = + 6.64$$

$$C_6H_9N_3O_2 = + 9.77$$

Diese Zahlen weichen von den Angaben von A. Kossel ab. Es ist aber wohl denkbar, dass diese Differenz auf die Verdünnung der von mir untersuchten Lösung zu beziehen ist.

Argininfraction.

Ein Theil der Lösung des Argininnitrats wurde mit Kupferoxydhydrat gemischt, auf dem Wasserbade erwärmt, filtrirt, abgedampft und über Schwefelsäure stehen gelassen. Der entstandene krystallinische Niederschlag wurde durch viermaliges Umkrystallisiren aus heissem Wasser gereinigt und bis zum constanten Gewicht über Schwefelsäure getrocknet. Die ausgeschiedenen Krystalle bestanden aus einem Salz, dessen Lösung alkalisch reagirte und welches bei der Analyse folgende Werthe ergab:

0.4469 g der im Vacuumexsiccator getrockneten Substanz verloren bei 105° C. 0.0378 g an Gewicht und gaben beim Glühen 0.0577 g CaO . 0.385 g derselben Substanz nahmen bei 105° C. 0.0366 g an Gewicht ab und lieferten 0.0505 g CaO .

	Gefunden:	Berechnet für $(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu \cdot NO_3 \cdot 2H_2O$
H_2O	9.49% , 9.07% ,	9.17% ,
Cu	10.46% , 11.05% ,	10.76% ,

Nach Schulze und Steiger¹⁾ enthält das Argininkupfernitrat, aus etiolirten Lupinenkeimlingen dargestellt, 3 Moleküle Krystallwasser; nach Hedin²⁾ enthält dieses aus Hornsubstanz erhaltene Salz auch 3 Moleküle Krystallwasser. Das aus dem

1) E. Schulze und E. Steiger. Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 43—55.

2) S. Hedin. Diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 186—192.

Clupein gewonnene Arginkupfernitrat enthält nach W. Gulewitsch¹⁾ $3\frac{1}{2}$ Moleküle Krystallwasser.

Dieses Salz wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt, und das spezifische Drehungsvermögen des erhaltenen Arginin-nitrats ermittelt.

Die Beobachtung gab folgendes Resultat:

$$l = 4 \text{ dm. } t = 22^{\circ}, p = 6.454, d = 1.0225, \alpha = + 2.50$$

$$(\alpha_{D}^{22^{\circ}} \text{ für } C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 = + 9.47$$

$$> > C_6H_{14}N_4O_2 = + 12.90)$$

Diese Zahlen stimmen mit den für das aus Clupein dargestellte Arginin-nitrat von Gulewitsch gefundenen vollkommen überein.²⁾

Ich habe das spezifische Drehungsvermögen des Arginin-monochlorids ermittelt. Dieses wurde in folgender Weise aus Arginin-nitrat dargestellt. Eine Lösung von Arginin-nitrat wurde durch Silbernitrat und Barythydrat in mehrfach erwähnter Weise gefällt; der abgesaugte Niederschlag mehrere Male mit Wasser ausgewaschen und durch Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wurde durch Schwefelwasserstoff von Silber, durch Barythydrat von Schwefelsäure befreit, mit Thierkohle entfärbt, durch Chlorwasserstoffsäure ganz genau neutralisirt, verdampft und über Schwefelsäure stehen gelassen, wobei sie krystallisirte. Ich fügte nun Alkohol hinzu, solange sich noch eine Vermehrung des krystallinischen Niederschlags wahrnehmen liess, saugte die Krystalle sodann ab und krystallisirte sie noch zweimal in derselben Weise um.

Das von mir untersuchte Argininchlorid enthielt ein halbes Molekül Krystallwasser. Das von Schulze und Steiger erhaltene Argininchlorid, aus Lupinenkeimlingen dargestellt, enthielt kein Krystallwasser;³⁾ das von Hedin aus Horn gewonnene Salz ein Molekül,³⁾ wie letzteres verhielt sich das von Gulewitsch untersuchte.³⁾

1) W. Gulewitsch, Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 178—215.

2) W. Gulewitsch, l. c.

3) l. c.

Die Elementaranalyse der im Vacuumexsiccator getrockneten Substanz gab folgende Resultate:

0.1867 g der Substanz gaben 42.2 ccn. N_2 bei $18^\circ C.$ und 748 mm. Bar.
0.1990 g — — — — — 0.2378 g CO_2 und 0.1346 g H_2O .

0.2590 g verloren bei $135-140^\circ$ 0.009 g an Gewicht.

Gefunden:		Berechnet für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl + \frac{1}{2} H_2O$:
C	32.59 o	32.80 o
H	7.52 o	7.29 o
N	25.70 o	25.51 o
H_2O	3.60 o	4.10 o

Die Resultate der Polarisationsuntersuchung sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Anzahl der Moleküle HCl auf 1 Molekül $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$	l	t	p	d	α	$(\alpha)_D^{25}$ für	
						$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$	$C_6H_{14}N_4O_2$
0	4 dm	22°	7.092	1.0235	+ 2.69	— 9.27	— 11.21
4	4 dm	22°	4.625	1.0286	+ 3.63	— 19.07	+ 23.07

Diese Zahlen sind etwas niedriger, als die von Gutewitsch¹⁾ und von Schulze und Steiger¹⁾ ermittelten. Nachdem F. Kutscher ein neues Arginin aufgefunden hat,²⁾ welches sich von dem bisher bekannten unter Anderem dadurch unterscheidet, dass es optisch inactiv ist, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass dem von mir untersuchten Chlorid eine gewisse Menge des inactiven Arginins beigemengt ist. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung habe ich nicht angestellt.

Lysinfraktion.

Die vom Silberniederschlag des Histidins und Arginins abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit dem Waschwasser vereinigt, durch Schwefelsäure vom Baryt, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, eingedampft und nach der Methode von

¹⁾ l. c.

²⁾ F. Kutscher, Sitzungsberichte der Marburger Gesellschaft für die Beförderung der gesammten Naturwissenschaften, Vom Juni 1896.

A. Kossel¹⁾ auf Lysin verarbeitet. Der Lösung, bis zum dicken Syrup eingedampft, wurde eine gesättigte alkoholische Lösung von Pikrinsäure hinzugefügt, solange noch die Bildung eines krystallinischen Niederschlags bemerkbar war. Der abgesaugte Niederschlag wurde mit Alkohol und Aether ausgewaschen und in einem Scheidetrichter durch verdünnte Salzsäure in Gegenwart von Aether zersetzt. Nachdem die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Aether völlig entfernt war, wurde die Lösung mit Thierkohle entfärbt, bis zum dicken Syrup eingedampft, mit concentrirter Salzsäure gemischt und noch weiter bis zur Krystallisation verdickt. Der abgekühlten, theilweise krystallinischen Masse wurde Alkohol und wenig Aether allmählich zugefügt, solange noch ein ganz krystallinischer Niederschlag entstand. Der Niederschlag wurde sodann abgesaugt und in der beschriebenen Weise zweimal mit Hülfe von Alkohol und Aether umkrystallisirt.

Die Elementaranalyse der in Vacuumexsiccator bis zum constanten Gewicht getrockneten Substanz gab folgende Resultate:

0,1475 g Substanz gaben	0,177 g CO ₂	und	0,1018 g H ₂ O
0,1072 » » » »	0,1302 » CO ₂	»	0,0766 » H ₂ O
0,1163 » » » »	0,1507 » AgCl		
0,2445 » » » »	0,0004 » Asche		
0,2764 » » » »	0,0005 » »		

Gefunden:		Berechnet für:	
		C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ · 2HCl	
C	32,73% 33,12%	—	32,87%
H	7,67% 7,93%	—	7,31%
HCl	— —	32,95%	33,33%
Asche	0,18% 0,16%	—	—

Die Substanz zeigte keinen scharfen Schmelzpunkt: sie fing bei 194—195° C. zu schmelzen an; bei 200—202° entstanden die Gasbläschen.

Die wässrige Lösung dieses Salzes reagirt stark sauer.

Die Resultate der Polarisationsuntersuchung dieses Salzes sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

¹⁾ A. Kossel. Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 165—189.

Anzahl der Molek. HCl auf 1 Molekül $C_6H_{13}N_2O_2 \cdot 2HCl$	l	t	p	d	α	$(\alpha)_D^{20}$ für	
						$C_6H_{13}N_2O_2 \cdot 2HCl$	$C_6H_{13}N_2O_2$
0	4 dm	20° C.	18,430	1,0569	+ 13,00	+ 16,68	+ 25,02
0	4	20°	11,067	1,0324	7,48	16,36	24,54
0	4	20°	5,606	1,0167	3,66	16,05	24,07
0	4	20°	2,835	1,0081	1,78	15,57	23,35
1	4	20°	11,719	1,0455	8,44	17,22	25,83
2	4	20°	9,762	1,0453	7,04	17,25	25,87
4	4	20°	7,299	1,0454	5,19	17,00	25,50
8	4	20°	4,844	1,0460	3,45	17,02	25,53

Da das Lysin bei der Darstellung aus dem Phosphorwolframat mit Baryt in Berührung bleibt, so schien es mir von einigem Interesse zu sein, die Wirkung des Baryts auf diese Base im Polarisationsapparat zu verfolgen. Diese Versuche wurden in folgender Weise angestellt. Ich bereitete mir eine Lösung von Lysincarbonat und stellte die Drehung derselben fest — Lösung I der folgenden Tabelle. Darauf wurde dieser Lösung zuerst Barytwasser zugesetzt, so lange noch ein Niederschlag von Baryumcarbonat entstand, und nachher ein gleiches Volumen einer gesättigten Lösung von Barythydrat hinzugefügt; die Flüssigkeit in einem luftdicht zugeschlossenen Kolben im kochenden Wasserbade 3 Stunden gehalten, abgekühlt, mit Kohlensäure behandelt, auf dem Wasserbade abgedampft, durch Thierkohle entfärbt und von Neuem im Polarisationsapparat untersucht — Lösung II der folgenden Tabelle.

Lösung III der Tabelle wurde in der beschriebenen Weise 22 Stunden behandelt.

Die IV. Lösung wurde untersucht, nachdem sie bei 100° mit Baryumhydrat gesättigt, 42 Stunden im kochenden Wasserbade gehalten und durch Kohlensäure von Barythydrat befreit war. Der Gehalt aller dieser Lösungen an Lysin, wurde aus dem Gehalt an Stickstoff berechnet.

Bei diesen Behandlungen war eine schwache Entwicklung von alkalischen Dämpfen zu constatiren.

Die Resultate der Polarisationsuntersuchungen der genannten Lösungen sind folgende:

Lösungen	l	t	p	d	α	$(\alpha)_D^{20}$ für $C_6H_{11}N_2O_2$
I.	1 dm	20°	3,683	1,0178	+0,64	+17,09
II.	1 "	22°	2,599	1,0113	0,42	15,97
III.	4 "	22°	0,583	1,0014	0,28	11,97
IV.	4 "	22°	2,818	1,0777	1,22	10,04

Aus diesen und den vorhergehenden Versuchen sind folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Das von mir untersuchte Lysin dreht als Chlorid und als Carbonat nach rechts.

2. Die Erhöhung seines Drehungsvermögens unter der Einwirkung von Salzsäure ist bedeutend.

3. Das spezifische Drehungsvermögen dieses Lysins nimmt bei Verdünnung der Lösung, in Gegenwart von Salzsäure, nur ganz wenig ab, dass dadurch die Möglichkeit für eine genauere quantitative Bestimmung dieses Lysins als Chlorid gegeben wird.

4. Bei dem andauernden Erhitzen einer Lösung des Lysins mit Barythydrat nimmt ihr Drehungsvermögen allmählich ab. Man wird dieses bei den quantitativen Untersuchungen über diese Base berücksichtigen müssen.

Nachdem A. Kossel darauf hingewiesen hat, dass das Lysin-pikrat ein gut krystallisirendes, schwer lösliches Salz ist, welches sich zur Darstellung des Lysins besonders eignet,¹⁾ müssen Untersuchungen über die Löslichkeit dieses Salzes sehr erwünscht sein. Behufs Feststellung dieser Grösse habe ich das rohe Lysin-pikrat aus heissem Wasser dreimal umkrystallisirt, mit Alkohol und Aether ausgewaschen und im Exsiccator bis zum constanten Gewicht getrocknet.

Die Analyse gab folgendes Resultat:

0,1772 g Substanz lieferten 0,248 g CO_2 und 0,0812 g H_2O .

¹⁾ l. c.

	Gefunden:	Berechnet für:
		$C_8H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_2(NO_2)_4O_4$
C	38,23	38,40
H	5,09	4,53

Das Salz wurde in heissem Wasser gelöst, die Lösung abgekühlt, bei 21–22°C. mehrere Stunden stehen gelassen und filtrirt. 5 cem. des Filtrats gaben 0,027 g Substanz, bei 105 getrocknet. Also zeigte sich, dass die bei 21–22°C gesättigte wässrige Lösung von Lysinmonopikrat 0,54% dieses Salzes enthielt.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. A. Kossel für die Ueberlassung der Themata und für die mir in reichem Maasse gewährte Unterstützung bei meiner Arbeit meinen herzlichsten Dank zu sagen.