

Ueber ein neues Histon aus Fischsperma.

Von

Robert Ehrström aus Helsingfors.

Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)
(Der Redaction zugegangen am 28. März 1901.)

In der Absicht, Protamin darzustellen, liess ich aus Finland Testikeln des dort allgemein vorkommenden Fisches *Lota vulgaris* kommen. Trotzdem diese Hoden vollkommen reif waren, konnte ich aus ihnen kein Protamin gewinnen, wohl aber eine reichliche Menge eines Körpers, der die Eigenschaften eines Histons besass. Die Testikeln des *Lota vulgaris*, welcher dem zoologischen System nach zur selben Familie wie *Gadus Morrhua*, den Gadiden, gehört, zeigte sich, ebenso wie die Hoden dieser Fischart,¹⁾ frei von Protamin, im Gegensatz zu einer Anzahl anderer in dieser Richtung untersuchten Fische, wie Lachs, Hering, Stör, Makrele u. s. w. Ebenso scheint es sich mit dem Karpfen zu verhalten, vorausgesetzt, dass man berechtigt ist, die aus reifen Karpfentestikeln von Miescher²⁾ isolirte peptonartige Substanz von basischen Eigenschaften als ein Histon auszusprechen. Einen gleichartigen basischen Eiweissstoff erhielt Miescher aus unreifen Lachstestikeln und Bang³⁾ stellte ein Histon, «Scombron», aus unreifen Hoden der Makrele dar. Es kann ausserdem noch hinzugefügt werden, dass Mathews⁴⁾ aus den reifen Spermatozoen eines Seeigels, *Arabacia*, ein Histon, das Arabacin, gewann.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 191.

2) Verhandl. der naturforsch. Gesellsch. zu Basel, Bd. VI, S. 138.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 463.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 399.

Aller Wahrscheinlichkeit nach enthalten die Testikeln sämtlicher Fischarten in unreifem Zustande Histon, und zwar nach Kossel an Nucleinsäure gebunden. Dieses nucleinsaure Histon geht bei einigen Fischarten beim Reifwerden in nucleinsaures Protamin über, während dieser Process bei anderen nicht eintritt.

Nachdem ich eine Anzahl Versuche in verschiedenen Richtungen angestellt hatte, um die zweckmässigste Methode zur Isolirung des Lota-Histons zu finden, erwies sich folgendes Verfahren als das bequemste. Die Testikeln wurden zunächst in der von Kossel¹⁾ beschriebenen Weise behandelt und mit Alkohol und Aether ausgezogen. Die getrocknete Spermatozoenmasse wurde mit concentrirter Salzsäure in der Reibschale zerrieben und eine Stunde bei Zimmertemperatur der Einwirkung der Säure ausgesetzt. Darauf wurden drei bis vier Volumen Wasser hinzugefügt und der Niederschlag, welcher die Nucleinstoffe enthielt, abfiltrirt. Das Filtrat wurde mit Natriumhydrat neutralisirt und die neutralisirte Flüssigkeit mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt, wobei ein reichlicher Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltrirt und auf dem Wasserbad in etwa halbprocentiger Salzsäure aufgelöst. Aus der salzsauren Lösung wurde das Histon mit Ammoniak gefällt, wieder mit Salzsäure gelöst und mit Ammoniak gefällt, und dieser Process danach noch einmal wiederholt. Schliesslich wurde die Substanz gut mit Wasser ausgewaschen.

Die so gereinigte Substanz war sowohl in Wasser wie Neutralsalzlösungen von verschiedener Concentration vollkommen unlöslich, löste sich dagegen in Säuren und Alkalien. Eine Lösung der Substanz in verdünnten Säuren konnte mit Natriumhydrat für Lackmus neutral gemacht werden, ohne dass das Histon sich ausschied. Eine solche neutrale Lösung gab folgende Reactionen. Alkalihydrat oder Barythydrat, bis zur alkalischen Reaction hinzugefügt, erzeugten einen Niederschlag, der sich im Ueberschuss der Reagentien löste. Ammoniak gab ebenso einen im Ueberschuss löslichen

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII. S. 178.

Niederschlag. Wenn Ammoniumchlorid zur ammoniakalischen Lösung hinzugefügt wurde, erschien wiederum ein wenn auch unvollständiger Niederschlag. Natriumpikrat und Ferrocyankalium gaben Niederschläge, welche sich bei Alkalizusatz lösten. Serumalbumine gaben gleichfalls einen in Ammoniak oder Alkalihydrat löslichen Niederschlag. Salpetersäure fällt den Körper nicht. Kupfersulfat, Quecksilbernitrat, Ferrichlorid und neutrales Bleiacetat erzeugen keinen Niederschlag, wohl aber basisches Bleiacetat. Wird die neutrale Histonlösung gekocht, scheidet sich ein in Säuren unlösliches Gerinnsel ab. Dagegen coagulirt eine saure Lösung des Körpers, also ein Salz des Körpers nicht. Eine mit Salzsäure bereitete Lösung dieses Histons wird nicht durch Alkohol gefällt, wogegen eine Lösung derselben in Schwefelsäure fällbar ist. Das Chlorid des basischen Eiweissstoffes ist demnach leicht löslich in Alkohol, das Sulfat schwerlöslich, ebenso wie die Chloride und Sulfate von verschiedenen Protaminen. Aether, auch in kleinen Mengen hinzugefügt, scheidet aus der Lösung das Histon in leichten, auf der Aetherschicht schwimmenden Massen ab. Dies Verhalten zeigt sich, wie mir Herr Professor Kossel mittheilte, auch bei Histonen anderen Ursprungs. Natriumchlorid salzt den Körper aus. Die Fällungsgrenzen für Ammoniumsulfat sind 4,1 und 4,9, d. h., wenn zu einer Histonlösung soviel Ammoniumsulfatlösung zugefügt wird, dass in 10 ccm. histonhaltiger Flüssigkeit 4,1 ccm. kalt gesättigte Ammoniumsulfatlösung enthalten sind, so beginnt das Histon auszufallen, und wenn in den 10 ccm. 4,9 ccm. gesättigte Ammoniumsulfatlösung enthalten sind, ist die Ausscheidung vollendet. Der Körper gibt schon in der Kälte schöne Biuretreaction und zwar mit violettem Farbenton. Die Xanthoproteinreaction ist positiv, Millon's Reaction schwach, aber deutlich positiv, Molisch's Reaction stark positiv, Adamkiewicz' Reaction schwach vorhanden.

Der aus Lota dargestellte Körper zeigt somit in seinen Reactionen recht bedeutende Abweichungen von den bisher gekannten Histonen. Dem Lota-Histon fehlen zwei der fünf Reactionen, welche Bang als charakteristisch für Histone

hat hervorheben wollen. Es ist weder durch Salpetersäure fällbar, noch verhält es sich beim Kochen seiner Lösung entsprechend diesen Angaben. Es unterscheidet sich weiter dadurch, dass es, durch Ammoniak gefällt, in Wasser und Neutral-salzlösungen unlöslich ist, oder wenigstens sehr schnell unlöslich wird. Es gibt auch positive Furoolreactionen, während Bang diese sowohl bei Thymus-Histon, wie Globin und Scobron vermisste. Dagegen gab das von Schulz¹⁾ dargestellte Globin Adamkiewicz' Reaction zwar schwach, aber ausgesprochen positiv, aber nicht Molisch's Reaction. Zwei Stickstoffanalysen von Lota-Histon nach Kjeldahl gaben ebenfalls abweichende Zahlen von dem bisher gekannten Stickstoffgehalt im Histon: 16,46% resp. 16,49%. Die entsprechende Zahl für Thymus-Histon ist nach Bang 18,35, für das Histon der rothen Blutkörperchen nach Kossel²⁾ 18,46, für Globin nach Schulz 16,89, für Lachs-Histon nach Miescher 17,64, für Scobron nach Bang 19,79 und für Gadus-Histon nach Kossel 18,65. Einen geringen Stickstoffgehalt scheint das Arbacin zu besitzen, dessen Sulfat 15,91% N ergab.

Ein Zweifel an der Zugehörigkeit des vorliegenden Körpers zur Histongruppe kann jedoch nicht vorliegen. Dafür sprechen deutlich seine ausgeprägten basischen Eigenschaften, und mit noch grösserer Bestimmtheit die Resultate einer quantitativen Bestimmung der Vertheilung des Basenstickstoffs. 29,5 g des Körpers wurden mit siedender Schwefelsäure während 14 Stunden zersetzt, und die Zersetzungsprodukte nach der von Kossel zum Theil in Gemeinschaft mit Kutscher³⁾ angegebenen Methode bestimmt, nur mit einer von Herrn Dr. Hart im hiesigen Laboratorium ausgearbeiteten Modification der Ammoniakbestimmung, die demnächst publicirt werden soll.

In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Zahlen zusammengestellt und zum Vergleich die entsprechenden von Kossel und Kutscher für Gadus-Histon und Thymus-Histon bestimmten Zahlen hinzugefügt.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 449.

2) Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 511.

3) Diese Zeitschrift Bd. XXXI, S. 165.

Vertheilung des Stickstoffs unter den Spaltungs- produkten

	des Lota-Histons	des Gadus-Histons	des Thymus-Histons
Gesamtmenge	100	100	100
A. Basen-Stickstoff	34.55	42.00	42.46
Davon <i>a</i> in Ammoniak	3.30	3.30	7.46
<i>b</i> in Histidin	4.12	3.30	1.79
<i>c</i> in Lysin	3.69	8.50	8.04
<i>d</i> in Arginin	23.44	26.90	25.17
B. Stickstoff in nicht be- stimmter Form	65.45	58.00	57.54
Davon Humin-Stickstoff	14.95	5.80	14.92

Die Menge der erhaltenen Basen in Procenten der zer-
setzten Körper:

	Lota-Histon	Gadus-Histon	Thymus-Histon
Zersetztes Histon	100	100	100
Ammoniak	0.66	0.74	1.66
Histidin	2.85	2.34	1.21
Lysin	3.17	8.30	7.7
Arginin	12.00	15.22	14.36

Die angeführten Zahlen zeigen deutlich die nahe Verwandtschaft zwischen den drei Körpern. Charakteristisch sind die basischen Eigenschaften, die damit offenbar in Zusammenhang stehende Fällbarkeit mit Ammoniak und der hohe Gehalt an Argininstickstoff. Das Lysin tritt in geringerer Menge auf, wie bei den übrigen Histonen, auch der Stickstoffgehalt des ganzen Moleküls ist etwas niedriger; immerhin ist die Gesamtmenge des Stickstoffs der harnstoffbildenden Gruppe und der Diamidosäuren eine relativ hohe. Bemerkenswerth ist auch das Vorkommen der Kohlehydratgruppe im Lota-Histon.

Zuletzt will ich die Gelegenheit benutzen, um Herrn Professor Kossel meinen verbindlichsten Dank für die mir angewiesene Arbeit und die mir dabei freundlichst gewährte Unterstützung beim Ausführen derselben auszusprechen.