

## Beiträge zur Kenntnis des Thymusnucleohistons.

Von  
**W. Huiskamp.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juni 1963.)

Die im wässrigen Thymusauszuge vorhandenen Nucleoproteide lassen sich auf zwei Weisen voneinander trennen; erstens, nach der Methode Malengreaus, durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat, zweitens durch Fällung mit Chlorcalcium. Bei der ersten Methode wird durch Zusatz von Ammonsulfat bis zu 45 % der Sättigung das Nucleoproteid mit niedrigem Phosphorgehalt (Nucléoalbumine A Malengreaus) vollkommen ausgefällt, während das Nucleohiston dabei noch in Lösung bleibt und erst durch eine höhere Konzentration von Ammonsulfat gefällt wird. Bei der zweiten Methode fällt nach Zusatz von Chlorcalcium das Nucleohiston vollständig aus, während das andere Nucleoproteid in Lösung bleibt: um den Niederschlag von Nucleohiston von den noch anhaftenden geringen Mengen des andern Nucleoproteids zu reinigen, kann man denselben (eventuell mit Hilfe von einigen Tropfen verdünnten Ammoniaks) in Wasser lösen und nochmals mit Chlorcalcium fällen.

Für die folgende Untersuchung habe ich die zweite Methode benutzt.

Es stellte sich im Laufe dieser Untersuchung heraus, daß das mit Chlorcalcium gefällte Nucleohiston streng genommen keine einheitliche Substanz darstellt, sondern daß hier ein Gemisch von mindestens zwei, einander zwar ähnlichen, jedoch in der Zusammensetzung und namentlich im Phosphorgehalt verschiedenen Nucleohistonen vorliegt.

Wie von Bang und von mir gefunden wurde, kann man das Nucleohiston aus dem Thymusauszuge durch Zusatz von Kochsalzlösung bis zu einem Gehalt von 0,6—0,9% teilweise fällen. Dieses mittels Kochsalz bereitete Nucleohiston besitzt einen erheblich höheren Phosphorgehalt als die mit Chlorcalcium gefüllte Substanz. Weil nun die Fällung durch 0,6 bis 0,9% ige Kochsalzlösung unvollständig ist, so läßt sich hieraus schließen, daß im Thymusextrakte zwei Nucleohistone vorhanden sind, deren eines, mit höherem Phosphorgehalt durch 0,6- bis 0,9% ige Kochsalzlösung gefällt wird, während das andere dabei gelöst bleibt: beide sind dann durch 0,1% iges Chlorcalcium vollständig fällbar.

Es folgen hier die Bestimmungen des Phosphorgehalts im mittels 0,7% igen Kochsalzes dargestellten Nucleohiston.

Die Substanz wurde auf folgende Weise bereitet:

Aus dem wässerigen Thymusauszuge wurde das Nucleohiston durch Zusatz von Kochsalzlösung bis zu einem Gehalt von ungefähr 0,7% gefällt: der Niederschlag wurde abzentrifugiert und wieder in Wasser gelöst: darauf wurde die Lösung noch zweimal auf dieselbe Weise mit Kochsalz gefällt. Den durch die dritte Fällung erhaltenen Niederschlag werde ich als Präparat A bezeichnen. Bei jeder Fällung blieb ein Teil des Nucleohistons gelöst: diejenige Menge, welche bei der letzten Fällung in Lösung blieb, wurde mit Essigsäure niedergeschlagen: diesen Niederschlag bezeichne ich als Präparat B. Die beiden Präparate wurden sodann mit 92% igem Alkohol einige Male (jedesmal 24 Stunden) extrahiert, wodurch der Überschuß von Kochsalz entfernt wurde: sie wurden dann unter Äther gebracht und getrocknet.

Präp. A. 0,4717 g der bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz lieferten (nach Veraschung mittels Schwefelsäure und Salpetersäure nach Neumann) 0,0747 g  $Mg_2P_2O_7$ . P-Gehalt = 4,42%.

Präp. A (andere Bereitung). 0,3148 g Substanz lieferten 0,0493 g  $Mg_2P_2O_7$ . (Veraschung mit Salpeter und Soda) P-Gehalt = 4,37%.

Präp. B 1. 0,2900 g Substanz lieferten 0,0473 g  $Mg_2P_2O_7$ . (Veraschung mit Salpeter und Soda) P-Gehalt = 4,55%.

2. 0,3045 g Substanz lieferten 0,0494 g  $Mg_2P_2O_7$ . (Veraschung nach Neumann) P-Gehalt = 4,53%.



Wie man sieht, ist der Phosphorgehalt des mittels Kochsalzlösung dargestellten Nucleohistons bedeutend höher als derjenige des mittels Chlorcalcium bereiteten Nucleohistons, welchen ich zu 3,75 % gefunden habe.<sup>1)</sup>

Malengreau hat die Vermutung ausgesprochen, daß, weil die Thymusdrüse kein Dauerorgan darstellt, vielleicht auch die Zusammensetzung (und namentlich der Phosphorgehalt) der darin enthaltenen Eiweißkörper nicht immer dieselbe sein möge. Diese Bemerkung ist gewiß sehr beachtenswert. Ich habe früher den Phosphorgehalt zweier aus verschiedenen Drüsen dargestellten Nucleohistonpräparate nahezu gleich gefunden, doch schien es mir wünschenswert, daraufhin nochmals Versuche anzustellen.

Es wurde dazu Ca-Nucleohiston durch zweimalige Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  aus zwei verschiedenen Drüsen bereitet. Eines dieser Präparate wurde zweimal mit 0,4%iger Essigsäure, sodann mit Wasser ausgewaschen; das andere wurde mit 5%iger Essigsäure, darauf mit Wasser ausgewaschen. Beide Präparate wurden mit Alkohol und Äther behandelt und zu weißen Pulvern getrocknet.

Die Phosphorbestimmungen ergaben für das erste Präparat 3,77 % P, für das zweite 3,79 % P. (Durch die Auswaschungen mit Essigsäure wurde in beiden Fällen die Calciumverbindung des Nucleohistons zerlegt; auf Ca-Nucleohiston, welches  $4\frac{1}{3}\%$  Ca enthält, berechnet, findet man resp. 3,72 und 3,74 % P.)

Die Tatsache, daß aus vier verschiedenen Drüsen Nucleohiston mit nahezu demselben Phosphorgehalt bereitet werden konnte, scheint mir zu dem Schluß zu berechtigen, daß es sich hier jedenfalls nicht um eine erheblich schwankende Größe handelt.

Was nun das zweite phosphorärmere Nucleohiston angeht, so habe ich dieses auf folgende Weise dargestellt. (Ich möchte im folgenden das phosphorreichere Nucleohiston als  $\alpha$ -Nucleohiston, das phosphorärmere als  $\beta$ -Nucleohiston bezeichnen.)

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 177.

Durch zweimalige Fällung des Nucleohistons mit  $\text{CaCl}_2$  wurde zuerst das Nucleoprotein entfernt. Sodann wurde der Niederschlag von Nucleohiston mit Wasser gemischt, worin es sich nicht vollständig löst, sondern teilweise eine feine Suspension bildet. Es wurde darauf Kochsalz bis zu einem Gehalt von ungefähr 0,7% zugesetzt. Das Nucleohiston mit höherem Phosphorgehalt fällt dann aus, während das  $\beta$ -Nucleohiston wenigstens größtenteils gelöst bleibt. (Teilweise wird aber das  $\beta$ -Nucleohiston mitgefällt, wie sich daraus schließen läßt, daß der Phosphorgehalt des Niederschlags zwar höher als 3,75 ist, jedoch niedriger als der P-Gehalt des durch dreimalige Fällung mit Kochsalz gereinigten  $\alpha$ -Nucleohistons.) Der Niederschlag läßt sich sehr leicht abzentrifugieren und aus der vom Niederschlage getrennten Flüssigkeit kann das  $\beta$ -Nucleohiston mit Essigsäure gefällt werden.

Die Phosphorbestimmung dreier auf diese Weise bereiteten Präparate von  $\beta$ -Nucleohiston, welche nach Neumanns Methode verascht wurden, ergab folgendes Resultat:

I. 0,2675 g der bei  $110^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz lieferten 0,0291 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . P-Gehalt = 3,04%.

II. 0,2431 g Substanz lieferten 0,0278 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . P-Gehalt = 3,19%.

III. 0,2770 g Substanz lieferten 0,0286 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . P-Gehalt = 2,88%.

Im Mittel findet man also für den Phosphorgehalt des  $\beta$ -Nucleohistons 3,04% P.

Sowohl aus  $\alpha$ - wie aus  $\beta$ -Nucleohiston läßt sich mittels verdünnter Salzsäure in reichlicher Menge Histon bereiten.

Das Verhalten der beiden Nucleohistone gegen Halbsättigung mit Ammonsulfat ist folgendes. Betrachten wir zuerst das Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nucleohiston, so wie es durch zweimalige Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  aus Thymusextrakt erhalten werden kann. Wäscht man dieses Ca-Nucleohiston zweimal mit verdünnter (0,3- bis 0,4% iger) Essigsäure, sodann mit Wasser aus, so läßt sich der Niederschlag in Wasser mit Hilfe von Ammoniak leicht zu einer gegen Lackmus neutralen Flüssigkeit lösen.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Durch die Auswaschung mit Essigsäure wird das Calcium aus dem Niederschlage entfernt. Es ist dies insofern nötig, als sonst bei dem spätern Zusatz von Ammonsulfat das Calcium als  $\text{CaSO}_4$  ausfallen würde, wobei nachweislich Eiweiß mitgerissen wird.



Wenn diese Lösung gegen Lackmus möglichst vollkommen neutral ist, so entsteht bei Halbsättigung mit Ammonsulfat, auch wenn man die Flüssigkeit 24 Stunden stehen läßt, kein oder doch nur ein äußerst geringer Niederschlag. Wenn man dagegen die Nucleohistonlösung vor dem Zusatz von Ammonsulfat mit Ammoniak deutlich alkalisch macht, so entsteht nach Halbsättigung mit Ammonsulfat in kurzer Zeit ein großer flockiger Niederschlag, ohne daß aber alles Nucleohiston ausgefällt wird. Die Lösung von  $\beta$ -Nucleohiston wird bei schwach alkalischer Reaktion in kurzer Zeit und zwar anscheinend vollständig durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt. Es wird dagegen in einer Lösung von  $\alpha$ -Nucleohiston unter diesen Umständen kein Niederschlag hervorgerufen: zur Fällung dieser Lösung ist ein weit höherer Gehalt an Ammonsulfat erforderlich. Dieses verschiedene Verhalten des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nucleohistons macht es wahrscheinlich, daß der Niederschlag, welcher bei schwach ammoniakaler Reaktion in dem Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nucleohiston durch Halbsättigung mit Ammonsulfat entsteht, aus  $\beta$ -Nucleohiston besteht.

Durch Extraktion mit verdünnter Salzsäure habe ich aus  $\alpha$ -Nucleohiston ein Nuclein erhalten, dessen Phosphorgehalt 7,56% beträgt. Das  $\alpha$ -Nucleohiston wurde dazu mit 1%iger Salzsäure gemischt: nachdem das Gemisch 18 Stunden gestanden hatte, wurde das Nuclein abzentrifugiert und mit 0,8%iger Salzsäure ausgewaschen. Die Phosphorbestimmungen zweier verschiedener Präparate ergaben resp. 7,50 und 7,61% P.

Das  $\beta$ -Nucleohiston lieferte nach derselben Behandlung ein Nuclein, dessen Phosphorgehalt 7,33% betrug.

Beide Nucleine gaben schwache, jedoch deutliche Biuret- und Xanthoproteinreaktion.

Der Phosphorgehalt der beiden Nucleine ist annähernd derselbe: ob jedoch beide Körper identisch sind, muß ich dahingestellt sein lassen.

Es bleibt hier noch ein Einwand zu besprechen übrig, welchen man gegen die Annahme von der Existenz zweier Nucleohistone machen könnte. Es wäre denkbar, daß durch zweimalige Fällung des Nucleohistons mit Chlorealcium dasselbe

nicht genügend von Nucleoproteid gereinigt wird: für die Bereitung des  $\beta$ -Nucleohistons wird nun aber das mittels  $\text{CaCl}_2$  dargestellte Nucleohiston mit Wasser gemischt und sodann das  $\alpha$ -Nucleohiston durch Zusatz von Kochsalz gefällt. Weil das Nucleoproteid in der betreffenden Kochsalzlösung sehr gut löslich ist, geht diese möglicherweise vorhandene Verunreinigung in das Filtrat über. Aus diesem Filtrate wird das  $\beta$ -Nucleohiston durch Fällung mit Essigsäure hergestellt. Man könnte daher das  $\beta$ -Nucleohiston als ein Gemisch von Nucleoproteid und in Lösung gebliebenem  $\alpha$ -Nucleohiston betrachten. Durch die Anwesenheit des Nucleoproteids (welches nur ungefähr 1% P enthält) erkläre sich der niedrige Phosphorgehalt des  $\beta$ -Nucleohistons. (Das  $\alpha$ -Nucleohiston enthält + 4,5% P; damit durch Beimischung einer Substanz mit 1% P dieser Gehalt bis auf + 3% erniedrigt würde, mußte allerdings die Verunreinigung 40% betragen.)

Gegen diese Darstellung läßt sich erstens anführen, daß, wie schon bemerkt, in der Lösung des mittels  $\text{CaCl}_2$  bereiteten und mit Essigsäure ausgewaschenen Nucleohistons, falls nur die Reaktion neutral ist, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat kein Niederschlag hervorgerufen wird; das Nucleoproteid wird aber, wie Malengreau zeigte, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat vollständig gefällt: meine Befunde an mit Essigsäure (nach Entfernung des Nucleohistons durch  $\text{CaCl}_2$ ) gefällten und mittels Ammoniak bis zur neutralen Reaktion gelösten Nucleoproteid stimmen damit völlig überein. Eine merkbare Verunreinigung des Nucleohistons mit Nucleoproteid kann daher als ausgeschlossen gelten.

Zweitens kann man das  $\beta$ -Nucleohiston selbst auf seinen Gehalt an Nucleoproteid prüfen. Es ist schon bemerkt worden, daß der Phosphorgehalt des Nucleins aus  $\beta$ -Nucleohiston demjenigen aus  $\alpha$ -Nucleohiston nahezu gleichkommt. Bei der Behandlung mit Salzsäure muß also das Nucleoproteid sich in der Histonlösung befinden, denn sonst würde der Phosphorgehalt des Nucleins weit niedriger gefunden sein worden: weil das Nucleoproteid in 0,8% iger Salzsäure sehr leicht löslich ist, kann dieses Verhalten auch von vornherein erwartet



werden. Ein bequemes Mittel, die Anwesenheit des Nucleoproteids in der Histonlösung zu zeigen, wird durch die Dialyse gegeben: sobald der Gehalt an Säure sehr niedrig wird, fällt das Nucleoproteid aus. Tatsächlich findet man nun, daß bei der Dialyse einer aus  $\beta$ -Nucleohiston bereiteten, klar filtrierten Histonlösung keine Spur eines Niederschlags entsteht.

Über die Eiweißkörper der Thymusdrüse ist in der letzten Zeit eine neue ausführliche Arbeit von Bang erschienen.<sup>1)</sup> Der Autor beschreibt darin ein Nucleohiston mit sehr hohem Phosphorgehalt (5,33%). Es war mir diese Arbeit leider nur als Referat im Biochemischen Centralblatt zugänglich, weshalb eine Vergleichung mit dem hier Mitgeteilten an dieser Stelle nicht wohl möglich ist. Nur soviel glaube ich aber annehmen zu dürfen, daß Bang nur einen Teil des Nucleohistons und zwar denjenigen mit hohem Phosphorgehalt in Händen gehabt hat; die ganze Darstellungsweise (u. a. der Gebrauch, welcher dabei von Kochsalzlösungen gemacht wird) eignet sich nur dazu, Nucleohiston mit hohem Phosphorgehalt zu liefern. Der Phosphorgehalt des von Bang isolierten Nucleohistons ist allerdings noch höher als derjenige des von mir beschriebenen  $\alpha$ -Nucleohistons. Dies führt zu den Gedanken, ob vielleicht das  $\alpha$ -Nucleohiston oder auch beide Nucleohistonarten nicht jedes für sich noch wieder als Gemische von Substanzen mit verschieden hohem Phosphorgehalt zu betrachten seien.

Bang faßt das Nucleohiston als eine Verbindung von Nucleinsäure mit Histon auf und spricht daher von «nucleinsäurem Histon». Zur näheren Erörterung dieser Frage möchte ich einige Versuche über die Extraktion des Histons mittels Salzsäure mitteilen. Dabei wird in Übereinstimmung mit der Auffassung Lilienfelds als Nuclein diejenige Substanz bezeichnet, welche man erhält, wenn das Histon aus dem Nucleohiston vollständig entfernt worden ist.

Wenn das mittels Chlorecalcium aus Thymusextrakt bereitete Nucleohiston, also das Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nucleohiston, mit 0,2% iger Salzsäure gemischt und nach einiger

<sup>1)</sup> Archiv för Mathematik og Naturvidenskab. Bd. XXV. S. 1.

Zeit abfiltriert wird, so enthält das Filtrat eine große Menge Histon. Extrahiert man darauf, durch Übergießung des Filters mit 0.2%iger Salzsäure, noch einige Male, so stellt sich heraus, daß schon bald im Filtrate nur äußerst geringe Mengen Histon vorhanden sind; wenn man jetzt aber das Filter mit 0.5%iger Salzsäure übergießt, so enthält das Filtrat sofort wieder viel Histon. Die Abspaltung von Histon durch 0.2%ige Salzsäure geht also, nachdem in kurzer Zeit eine ziemlich große Menge abgespalten worden ist, nur äußerst langsam weiter, obwohl noch bei weitem nicht alles Histon entfernt worden ist. Zur Darstellung von Nuclein ist also die 0.2%ige Salzsäure kein geeignetes Mittel.

Jedoch führt auch die Extraktion mit 0.5%iger Salzsäure nicht zum Ziel. In mehreren Versuchen fand ich, daß durch 18stündige Extraktion mit 0.4—0.5%iger Salzsäure und darauffolgende Auswaschung mit Salzsäure von derselben Konzentration 28 bis 32% vom Nucleohiston abgespalten wird, während bei der Anwendung von 0.7—0.8%iger Salzsäure in derselben Zeit ungefähr 40% abgespalten wird.<sup>1)</sup> Läßt man auf das mit 0.7—0.8%iger HCl behandelte Nucleohiston stärkere Salzsäurelösungen einwirken (z. B. 1.5%ige HCl), so findet man im Filtrate nur noch sehr wenig Histon. Mittels 0.8%iger Salzsäure läßt sich also das Histon bis auf geringe Reste abspalten. Untersucht man aber das Filtrat des mit 0.8%iger Salzsäure behandelten Nucleohistons näher, so stellt sich heraus, daß darin neben Histon noch eine andere Substanz, wenn auch in geringer Menge, vorhanden ist.

Zur Darstellung dieser Substanz wird die Histonlösung mit Ammoniak neutralisiert, darauf mit Essigsäure schwach angesäuert; sodann wird  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{2}{3}$  des Volumens gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung zugesetzt: das Histon fällt dadurch

<sup>1)</sup> Die Menge des abgespaltenen Histons wurde entweder durch Wägung des abfiltrierten Nucleins und des im Filtrate befindlichen Histons bestimmt, oder auch aus dem P-Gehalt des Nucleins abgeleitet; weil das Histon kein P enthält und der P-Gehalt des Nucleohistons bekannt ist, läßt sich aus dem P-Gehalt des Nucleins die Menge des abgespaltenen Histons berechnen.



als grobflockiger Niederschlag vollständig aus. Der Niederschlag wird abfiltriert und dem Filtrate Pikrinsäurelösung in großem Überschuß zugesetzt: es entsteht dadurch eine starke Trübung und nach einiger Zeit findet man in der Flüssigkeit bei mikroskopischer Untersuchung zahlreiche sehr kleine, gelbe Kryställchen. Aller Wahrscheinlichkeit nach hat man es hier mit dem Pikrat einer basischen Substanz zu tun.

Zur weiteren Untersuchung wurde die krystallinische Substanz durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt: der Niederschlag löst sich schwer in kaltem, leicht in heißem Wasser: aus dieser Lösung kann durch Zusatz von Pikrinsäure das Pikrat wieder abgeschieden werden: setzt man der Lösung vorher Salze oder Säuren zu, so wird die Ausfällung durch Pikrinsäure erschwert. Das Pikrat ist in Alkohol löslich.

Zur Überführung in das Sulfat wurde das Pikrat mit durch  $H_2SO_4$  angesäuertem, absolutem Alkohol und Äther (gleichen Teilen) behandelt. Man erhält dann das Sulfat als weiße Substanz. Hierbei muß bemerkt werden, daß vor der Behandlung mit Alkoholäther das Wasser möglichst vollständig aus dem Pikrate entfernt sein muß, weil das Sulfat zwar in dem Alkoholäther-Gemisch unlöslich ist, sich jedoch schon bei Anwesenheit von sehr geringen Mengen Wasser löst.

Die wässrige Lösung des Sulfats zeigt folgende Eigenschaften: Die Lösung gibt die Biuret- und Xanthoproteinreaktion (letztere jedoch schwach): sie wird durch Ammoniak, Natronlauge, Salpetersäure oder Metallsalze nicht gefällt. Pikrinsäure, Ammonpikrat und molybdänsaures Ammon, im Überschuß zugesetzt, verursachen einen Niederschlag. Eine neutrale Lösung des Sulfats verursacht einen Niederschlag in einer neutralen Lösung von Nucleoprotein aus Thymusextrakt bereitet.<sup>1)</sup> Bei der Dialyse diffundiert das Sulfat durch das Pergamentpapier. Von Histon unterscheidet sich die Substanz also dadurch, daß sie mit Pikrinsäure krystallinisch ausfällt, durch Ammoniak, Natronlauge und

---

<sup>1)</sup> Mit andern Eiweißkörpern wurden in dieser Hinsicht keine Versuche angestellt.

Salpetersäure nicht gefällt wird und durch Pergamentpapier diffundiert.

Eine nach Kjeldahl ausgeführte Bestimmung ergab für den N-Gehalt des Sulfats 14,58% N.

Die Substanz konnte sowohl aus  $\alpha$ - wie aus  $\beta$ -Nucleohiston dargestellt werden.

Aus dem Vorhergehenden ergibt sich, daß, wenn man versucht, mittels Salzsäure alles Histon aus dem Nucleohiston zu entfernen, dabei auch noch eine andere eiweißartige Substanz abgespalten wird.

Bang hat im Filtrate der mit Kochsalz gesättigten Nucleohistonlösung außer Nucleinsäure noch eine eiweißartige Substanz, welche jedoch kein Histon war, nachgewiesen: diese Substanz soll mit der Nucleinsäure salzartig verbunden sein: vielleicht ist dieser Körper mit der oben beschriebenen Substanz identisch.

Bei der Extraktion des  $\alpha$ - und des  $\beta$ -Nucleohistons mit 1%iger Salzsäure gelangt man, wie erwähnt, zu Nucleinen mit einem Phosphorgehalt von 7,5—7,6% resp. 7,3%. Diese Nucleine geben noch schwache Eiweißreaktionen und, wenn dieselben in Wasser mit Hilfe von Ammoniak oder Alkalien gelöst werden, so wird die Lösung durch Essigsäure gefällt. Es stellt sich also heraus, daß, obwohl durch die Salzsäure nicht nur das Histon, sondern dabei noch eine andere eiweißartige Substanz abgespalten worden ist, die ungelöst gebliebene Substanz dennoch keine Nucleinsäure darstellt. Es müssen also noch weitere eiweißartige Gruppen in diesen Nucleinen vorhanden sein. Was das  $\alpha$ -Nucleohiston anbelangt, habe ich diese Gruppen durch Extraktion des betreffenden Nucleins während 48 Stunden mit 2%iger Salzsäure teilweise abspalten können, wodurch eine den Nucleinsäuren schon recht nahe stehende Substanz mit 8,67% P erhalten wurde: dieser Körper gab nahezu keine Eiweißreaktionen: im Filtrate war kein Histon nachzuweisen.

Selbstverständlich wird durch diese Versuche die Richtigkeit der Auffassung Bangs, daß das von ihm erhaltene Nucleohiston nur aus Nucleinsäure und Histon besteht, nicht



bestritten, weil meine Versuche sich auf das gesamte Nucleohiston beziehen, während mir derjenige Teil des Nucleohistons mit sehr hohem Phosphorgehalt, welchen Bang erhalten hat, gar nicht isoliert zur Verfügung stand.

Die Bindung des Histons am Nuclein muß wahrscheinlich als eine salzartige aufgefaßt werden und zwar so, daß die Säurekomponente durch das Nuclein, der basische Bestandteil durch das Histon vertreten ist. Wenn dies der Fall ist, läßt sich erwarten, daß nach Abspaltung des Histons das Nuclein stärker saure Eigenschaften erhalten haben wird und z. B. mehr Calcium zu binden vermag, als das Nucleohiston. Im folgenden wird diese Annahme näher geprüft werden. Zu diesen Versuchen habe ich das mittels Chlorcalcium gefällte Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nucleohiston benutzt; die Durchführung der Versuche mit beiden Nucleohistonarten für sich gesondert wäre allerdings vorzuziehen, doch würde dadurch die Arbeit erheblich erschwert worden sein, während man doch auch in diesem Falle nicht mit Gewißheit hätte behaupten können, die Versuche seien mit einheitlichen Substanzen angestellt worden.

Das zweimal mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston wurde mit 0,5% iger Essigsäure ausgewaschen,<sup>1)</sup> sodann während 18 Stunden mit 0,5% iger Salzsäure extrahiert: das Nuclein<sup>2)</sup> wurde darauf abzentrifugiert und mit 0,5% iger Salzsäure weiter mit Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag wurde in Wasser mit Hilfe von Ammoniak bis zur gegen Lackmus schwach alkalischen Reaktion vollständig gelöst. Aus dieser Lösung wurde das Nuclein durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  bis zu einem Gehalt von 0,3% als Calciumsalz gefällt: die Fällung ist nahezu vollständig: um aber auch den gelöst gebliebenen Teil zu fällen, wurde nach dem Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  noch das doppelte Volumen

<sup>1)</sup> Diese Auswaschung geschah nur darum, weil es sich herausstellte, daß sich das Nuclein später besser löste, wenn vor der Extraktion mit Salzsäure das Calcium aus dem Nucleohiston entfernt worden war.

<sup>2)</sup> Es ist schon erörtert worden, daß durch Extraktion mit 0,5% iger Salzsäure nicht alles Histon abgespalten wird; der Bequemlichkeit wegen werde ich aber hier die gebildete Substanz Nuclein nennen.

Alkohol zugesetzt: der Niederschlag setzt sich dann sehr leicht ab und im Filtrate läßt sich kein Nuclein mehr nachweisen. Das so bereite Ca-Nuclein wurde durch Auswaschen in der Zentrifuge mit 92% ige<sup>m</sup> Alkohol vom überschüssigen  $\text{CaCl}_2$  getrennt, sodann unter absoluten Alkohol gebracht, abfiltriert und getrocknet.

Die Calciumbestimmung in dieser Substanz geschah auf folgende Weise: Die bei  $110^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz wurde mit 0,8% iger Salzsäure gemischt, wodurch das im Ca-Nuclein vorhandene Calcium als  $\text{CaCl}_2$  in Lösung geht. Das Gemisch blieb 24 Stunden stehen und wurde dann abfiltriert und das Filter mit 0,8% iger Salzsäure ausgewaschen. Das abfiltrierte Nuclein wurde nochmals auf dieselbe Weise behandelt, nach 24 Stunden abfiltriert und wieder mit Salzsäure gemischt: diese dritte Extraktion diente als Kontrolle für die vollständige Abspaltung des Calciums: in den folgenden Versuchen konnte aus dem dritten Filtrate keine wägbare Menge von Calcium mehr erhalten werden. Die beiden ersten Filtrate wurden gesammelt, mit Ammoniak alkalisch gemacht, darauf mit Essigsäure angesäuert und nochmals filtriert. Das Filtrat wurde durch Abdampfen eingeeengt und das Calcium sodann in der üblichen Weise mit oxalsaurem Ammon gefällt und als  $\text{CaO}$  gewogen.

Wenn auch der Calciumgehalt des Nucleins sich bei den folgenden Bestimmungen als beträchtlich höher herausstellt als derjenige des Ca-Nucleohistons, so muß dabei doch in betracht gezogen werden, daß das Nuclein ein geringeres Molekulargewicht besitzt als das Nucleohiston: es ist daher auch in dem Falle, daß wegen der Abspaltung des Histons keine neuen Säuregruppen freikommen, ein größerer Calciumgehalt des Nucleins zu erwarten. Indessen kann berechnet werden, um wieviel der Calciumgehalt des Nucleins deswegen erhöht sein muß, falls bekannt ist, wieviel Histon abgespalten worden ist. Die prozentische Menge des abgespaltenen Histons läßt sich nun bequem aus dem Phosphorgehalt des Nucleins in Vereinigung mit dem bekannten P-Gehalt des Nucleohistons ableiten. Den Calciumbestimmungen sind daher im folgenden die Phosphorbestimmungen hinzugefügt.



Präp. I. 0.4238 g Ca-Nuclein lieferten 0.0270 g CaO. Calciumgehalt = 4.55% ; folglich binden 100 mg Ca-freies Nuclein 4.77 mg Ca. 0.2189 g Ca-Nuclein lieferten 0.0417 g  $Mg_2P_2O_7$ . Phosphorgehalt = 5.32% ; das Ca-freie Nuclein enthält demnach 5.57% P.

Präp. II. 0.2767 g Ca-Nuclein lieferten 0.0159 g CaO. Calciumgehalt = 4.10% ; folglich binden 100 mg Ca-freies Nuclein 4.28 mg Ca. 0.2568 g Ca-Nuclein lieferten 0.0465 g  $Mg_2P_2O_7$ . Phosphorgehalt = 5.06% ; das Ca-freie Nuclein enthält demnach 5.27% P.

Präp. III. 0.3277 g Ca-Nuclein lieferten 0.0187 g CaO. Calciumgehalt = 4.08% ; folglich binden 100 mg Ca-freies Nuclein 4.25 mg Ca. 0.2454 g Ca-Nuclein lieferten 0.0450 g  $Mg_2P_2O_7$ . Phosphorgehalt = 5.12% ; das Ca-freie Nuclein enthält demnach 5.34% P.

Präp. IV. 0.4312 g Ca-Nuclein lieferten 0.0271 g CaO. Calciumgehalt = 4.49% ; folglich binden 100 mg Ca-freies Nuclein 4.70 mg Ca. 0.2355 g Ca-Nuclein lieferten 0.0441 g  $Mg_2P_2O_7$ . Phosphorgehalt = 5.23% ; das Ca-freie Nuclein enthält demnach 5.46% P.

Rechnet man den Phosphorgehalt des Nucleohistons (freie Säuren) zu 3.80% , so findet man im Falle des Präp. I, daß 68.18% des Nucleohistons als Nuclein zurückgeblieben ist, folglich 31.82% Histon abgespalten worden ist. In früheren Versuchen<sup>1)</sup> wurde der Calciumgehalt des Ca-Nucleohistons im Mittel aus drei Bestimmungen zu 1.34% gefunden. Eine neue Bestimmung, wobei das Calcium durch Auskochen mit 4% iger Essigsäure dem Ca-Nucleohiston entzogen wurde, ergab 1.392% Ca (0.8315 g der Substanz lieferten 0.0162 g CaO). Als Mittel aus diesen vier Bestimmungen resultiert ein Ca-Gehalt von 1.35% ; 100 mg Ca-freies Nucleohiston binden also 1.37 mg Ca. Falls wegen der Abspaltung des Histons keine neuen Säuregruppen freikämen, würden also 68.18 mg Nuclein auch 1.37 mg Ca binden. Tatsächlich wurde gefunden, daß 100 mg Nuclein 4.77 mg Ca zu binden imstande waren oder 68.18 mg Nuclein 3.25 mg Ca. Der Unterschied von 1.88 mg Ca muß dem Freiwerden von neuen Säuregruppen zugeschrieben werden. Führt man dieselbe Berechnung für die Präp. II, III und IV aus, so findet man, daß das Nuclein an Stelle von 1.37 mg Ca resp. 3.08 mg Ca, 3.02 mg Ca und 3.26 mg Ca bindet: die Unterschiede betragen also 1.71, 1.65 und 1.89 mg Ca.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 179.

Wenn die Bindung des Histon am Nuclein als eine salzartige aufgefaßt werden soll, so müssen den neu auftretenden Säuregruppen gegenüber im Histon basische Gruppen freiwerden, welche bei der Abspaltung durch die Salzsäure gesättigt werden. Wählen wir als Beispiel wieder Präp. I, so müssen die auf 100 mg Nucleohiston abgespaltenen 38,31 mg Histon eine mit 1,88 mg Ca äquivalente Menge von Cl gebunden haben. Es wird hier die Rechnung auf Schwefelsäure an Stelle von Salzsäure bezogen werden und es ergibt sich dann, daß 38,31 mg Histon 4,51 mg  $\text{SO}_4$  zu binden imstande sein müssen oder 100 mg Histon 14,18 mg  $\text{SO}_4$ . Für die Präparate II, III und IV findet man auf dieselbe Weise resp. 14,73, 13,77, und 14,84 mg  $\text{SO}_4$ . Im Mittel müssen also 100 mg Histon 14,38 mg  $\text{SO}_4$  zu binden imstande sein.

Zur Vergleichung wurde der Schwefelsäuregehalt des Histonulfats auf direktem Wege bestimmt. Das Histonulfat wurde dazu auf folgende Weise bereitet.

Zweimal mittels  $\text{CaCl}_2$  gefälltes Nucleohiston wurde während 18 Stunden mit 0,5% iger Salzsäure extrahiert: die Histonlösung wurde darauf abfiltriert, mit Ammoniak neutralisiert und mit Essigsäure schwach angesäuert: diese Flüssigkeit wurde nochmals filtriert. Aus dem Filtrate wurde das Histon durch Zusatz eines gleichen Volumens gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung gefällt. Der Niederschlag wurde mit durch Schwefelsäure angesäuertem Alkohol und Äther (gleichen Volumteilen) so lange extrahiert, bis derselbe völlig weiß geworden war.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Das gebildete Histonulfat ist in Alkoholäther völlig unlöslich: das Histonpikrat löst sich aber teilweise in Alkohol oder Alkoholäther: der nicht gelöste Teil bleibt auch beim weitem Auswaschen mit Alkohol ungelöst zurück, sodaß auf diese Weise das Histon vielleicht in zwei verschiedene Histonarten zerlegt werden kann. Der im Alkohol gelöste Teil kann aus dieser Lösung durch Zusatz von Schwefelsäure als Sulfat gefällt werden. Wenn beide Teile des Histonpikrats für sich gesondert in Sulfat umgewandelt werden, so zeigen die Lösungen dieser Sulfate völlig gleiches Verhalten gegen die Histonreagentien. Falls hier auch zwei Histonarten vorliegen, so hat dies doch mit der Sonderung des Nucleohistons in zwei Nucleohistonarten anscheinend nichts zu schaffen, denn sowohl das Histonpikrat aus  $\alpha$ -Nucleohiston als dasjenige aus



Der Überschuß von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurde durch Auswaschen mit gleichen Teilen Alkohol abs. und Äther entfernt. Schließlich wurden die Histonpräparate zu völlig weißen Pulvern getrocknet.

Für die Bestimmung des Schwefelsäuregehaltes wurde das Histonsulfat bei  $110^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet; die Substanz wurde sodann in 0.2% iger Salzsäure gelöst; das Histonsulfat löst sich in diesem Falle leicht und vollständig zu einer fast wasserhellen Flüssigkeit, welche noch alle Histonreaktionen gibt (es ist dies insofern bemerkenswert, als sich das Histon, falls dasselbe als freie Base getrocknet wird, anders verhält; es löst sich dann zwar noch ziemlich gut in verdünnter Salzsäure, immer aber bleibt ein Teil als glasige Gallerte ungelöst zurück<sup>1)</sup>). Die Lösung wurde bis zum Kochen erhitzt, wobei dieselbe keine Spur einer Trübung zeigte, die Schwefelsäure sodann in gewöhnlicher Weise durch Fällung mit  $\text{BaCl}_2$  als  $\text{BaSO}_4$  bestimmt.

Präp. I. 0.2324 g Histonsulfat lieferten 0.0879 g  $\text{BaSO}_4$ ;  $\text{SO}_4$ -Gehalt = 15.58 %.

Präp. II. 0.1822 g Histonsulfat lieferten 0.0702 g  $\text{BaSO}_4$ ;  $\text{SO}_4$ -Gehalt = 15.87 %.

Präp. III. 0.1644 g Histonsulfat lieferten 0.0629 g  $\text{BaSO}_4$ ;  $\text{SO}_4$ -Gehalt = 15.76 %.

Im Mittel wurde also für den  $\text{SO}_4$ -Gehalt des Histonsulfats 15.74% gefunden, oder 100 mg Histon binden 18.68 mg  $\text{SO}_4$ . Früher ist schon nachgewiesen worden,<sup>2)</sup> daß die Salze des Histons stark hydrolytisch dissociirt sind. Es wurde gefunden, daß, falls Methylorange als Indicator benutzt wird, die Histonlösung saure Reaktion zu zeigen beginnt, wenn das Histon etwa 6% Salzsäure gebunden hat, welches mit ungefähr 8% Schwefelsäure übereinstimmt. Aus dem Vorhergehenden erhellt, daß das Histon noch weit mehr Schwefelsäure zu binden ver-

$\beta$ -Nucleohiston bereitet, konnte in Alkohol nur teilweise gelöst werden. Es soll hier bemerkt werden, daß von Malengreau und neuerdings von Bang die Existenz von zwei Histonarten im Thymusauszuge angezeigt worden ist.

<sup>1)</sup> Letzteres wurde auch von Bang beobachtet (Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 463).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXIV, S. 32.

mag, falls man der hydrolytischen Dissociation möglichst vollständig vorbeugt; für die Auswaschung des Histonsulfats wurde daher absoluter Alkohol und Äther benutzt: in einem Falle, wobei einige Male mit 92%igem Alkohol ausgewaschen worden war, fand ich den  $\text{SO}_4$ -Gehalt bis auf 13.38% erniedrigt.

Die Menge  $\text{SO}_4$ , welche 100 mg Histon zu binden vermag (18.68 mg), zeigt sich nicht unbeträchtlich höher, als auf indirektem Wege aus dem Calciumgehalt des Nucleins abgeleitet worden war (14.38 mg). Eine Übereinstimmung ist aber auch nur dann zu erwarten, falls im Nucleohistonmolekül sämtliche basische Gruppen des Histons an Säuregruppen des Nucleins gebunden sind. Es läßt sich nun wahrscheinlich machen, daß dies nicht der Fall ist.

Es wurde dazu Ca-Nucleohiston mit verdünnter Essigsäure ausgewaschen und in Wasser durch Zusatz von Ammoniak gelöst. Die Lösung wurde mit gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung gefällt: der Überschub von Pikrinsäure wurde durch Auswaschen mit Alkoholäther entfernt. Es gelingt dabei nicht, auch wenn die Auswaschung genügend lange fortgesetzt wird, alle Pikrinsäure aus dem Niederschlage zu entfernen, und es ergibt sich also, daß das Nucleohiston Pikrinsäure zu binden vermag.<sup>1)</sup>

Die Überführung des Nucleohistonpikrats im Sulfat behufs Bestimmung der gebundenen Menge Schwefelsäure schien mir nicht statthaft, weil die dazu zu benutzende Schwefelsäure das Nucleohiston zerlegen könnte: es wurde daher die Menge der gebundenen Pikrinsäure selbst bestimmt.

Dazu wurde das Nucleohistonpikrat mit einem Gemisch von Alkohol und Äther, welchem Salzsäure bis zu einem Ge-

<sup>1)</sup> Das Nucleohistonpikrat ist in Alkoholäther ein wenig löslich; bei der Auswaschung bleibt daher schließlich das Filtrat, wenn auch sehr wenig, gelb gefärbt. Das in Alkoholäther gelöste Nucleohistonpikrat kann durch Zusatz von Säuren, wodurch das Pikrat zerlegt wird, gefällt werden; der abfiltrierte Niederschlag ist in Säuren unlöslich, in Ammoniak leicht löslich; letzteres zum Beweise, daß es sich hier nicht etwa um Histon handelt, welches auch, wie schon bemerkt, als Pikrat in Alkoholäther ziemlich gut löslich ist.



halt von 1% zugesetzt worden war, gemischt und durch ein gewogenes Filter abfiltriert; sodann wurde die Substanz mit salzsäurehaltigem Alkoholäther so lange extrahiert, bis dieselbe ganz weiß geworden war. Das Filter wurde mit Alkoholäther ausgewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch also das Gewicht des benutzten Nucleohistons bekannt war (es ist sehr wohl möglich, daß 1%ige Salzsäure auch in der alkoholisch-ätherischen Lösung das Nucleohiston in Nuclein und Histon zu zerlegen vermag: weil aber diese beiden Substanzen in Alkoholäther unlöslich sind, so erleidet man dadurch kein Verlust). Zur Entfernung der Salzsäure wurde das Filtrat bis zur Trockne abgedampft, der Trockenrückstand in Alkohol aufgenommen und nochmals bis zur Trockne abgedampft. Darauf wurde der Trockenrückstand in Wasser gelöst und in dieser Lösung die Pikrinsäure durch Titration mit  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH bestimmt (Indikator Phenolphthalein). Es wurde auf diese Weise gefunden, daß 0,9851 g Nucleohiston 0,1008 g Pikrinsäure zu binden imstande waren: 100 mg Nucleohiston binden also 10,23 mg Pikrinsäure oder 2,14 mg  $\text{SO}_4$ .

Es ist nun sehr wahrscheinlich, daß die freien basischen Gruppen, welche das Nucleohiston enthält, in erster Linie der Anwesenheit des Histons im Nucleohistonmolekül zugeschrieben werden müssen, weshalb der Wert, welchen man für den Schwefelsäuregehalt des Histonsulfats auf direktem Wege findet, höher ausfallen muß, als wenn derselbe aus dem Calciumgehalt des Nucleins abgeleitet worden ist. Neben Histon sind aber im Nucleohistonmolekül noch andere basische Substanzen vorhanden und es läßt sich daher der genaue Betrag dieser Erhöhung nicht angeben. Falls die freien basischen Gruppen des Nucleohistons alle am Histon haften, findet man, daß, weil das Nucleohiston ungefähr 40% Histon enthält, 40 mg Histon 2,14 mg  $\text{SO}_4$  mehr binden müssen als aus dem Ca-Gehalt des Nucleins abgeleitet werden kann, also 100 mg Histon 5,35 mg  $\text{SO}_4$  mehr: 100 mg Histon würden daher höchstens 19,73 mg  $\text{SO}_4$  ( $= 14,38 + 5,35$ ) binden können. Tatsächlich wurde gefunden, daß 100 mg Histon etwas weniger und zwar 18,68 mg  $\text{SO}_4$  zu binden imstande waren.

Die Salze, welche das Nucleohiston infolge der Anwesenheit von freien basischen Gruppen mit Säuren zu bilden vermag, sind stark hydrolytisch gespalten, wie sich daraus ableiten läßt, daß das mit Pikrinsäure gefällte Nucleohiston zwar durch Auswaschen mit Alkoholäther nicht von Pikrinsäure befreit werden kann, durch einmalige Auswaschung mit einer nicht allzu geringen Menge von Wasser jedoch schon nahezu weiß wird, während das Filtrat gelb gefärbt erscheint. Es handelt sich hier also jedenfalls um sehr schwach basische Gruppen. Hiermit im Einklang steht der Befund, daß auch die Salze des Histons einer beträchtlichen hydrolytischen Dissociation unterliegen. Nur bei der Anwesenheit von einem Überschuß von Anionen kann das Nucleohiston mit diesem in Wasser beständige Salze bilden.

Eine Beobachtung, welche wegen der Existenz von basischen Gruppen im Nucleohistonmolekül einer Erklärung zugänglich wird, ist die folgende. Wenn man Natrium- oder Calciumnucleohiston zur Darstellung der freien Nucleohistonsäure mit Essigsäure behandelt und darauf mit Wasser gut auswäscht, so löst sich der Niederschlag in Kochsalzlösung (z. B. 3%iger NaCl). Hiernach könnte man annehmen, daß das Nucleohiston als freie Säure in Kochsalzlösung löslich ist; in Wirklichkeit ist dies jedoch nicht der Fall: denn setzt man der Lösung einen Tropfen starker Essigsäure zu, wodurch der Gehalt der Lösung an NaCl kaum verringert wird, so fällt das Nucleohiston flockig aus. Der Vorgang der Auflösung in Kochsalz kann nun auf folgende Weise erklärt werden. Durch die Auswaschung mit Essigsäure erhält man die freie Säure des Nucleohistons: die basischen Gruppen dieses Körpers werden aber dabei durch die Essigsäure gebunden: doch wird durch die darauf folgende Auswaschung mit Wasser auch diese Verbindung zerlegt und es resultiert also eine Substanz, welche zu gleicher Zeit freie basische und Säuregruppen besitzt. Setzt man dieser Substanz NaCl zu, so vermag dieselbe sich sowohl mit dessen Anionen als mit den Kationen zu binden und das Ergebnis wird also sein, daß wieder ein lösliches Nucleohistonsalz gebildet wird: setzt man der Lösung Essigsäure zu, so werden die Na-Ionen dem Nucleohistonsalz entzogen und die freie Säure fällt wieder aus.