

Die Abbauprodukte des „Thymushistons“.

Von

Emil Abderhalden und **P. Rona.**

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. März 1904.)

Die als « Histone » bezeichneten Eiweißkörper sind durch einen hohen Gehalt an « Diaminosäuren » ausgezeichnet. Kossel und Kutscher¹⁾ fanden im « Thymushiston » 1,21% Histidin, 14,36% Arginin und 7,7% Lysin. Das Globin des Oxyhämoglobins enthält²⁾ 10,96% Histidin, 5,42% Arginin und 4,28% Lysin. Letzteres, welches ebenfalls zu den « Histonen » gerechnet wird, ergab bei der Hydrolyse mit Salzsäure dieselben Monoaminosäuren, wie die gewöhnlichen Eiweißkörper. Es war nun von Interesse, festzustellen, ob das aus dem « Nucleohiston » der Tymusdrüsen isolierte « Histon » ebenso kompliziert aufgebaut ist, wie die bisher untersuchten Eiweißkörper. Nachgewiesen waren außer den Diaminosäuren von Kutscher Tyrosin (6,31%) und Glutaminsäure (3,66%). Mit der Fischerschen Estermethode wurden nun isoliert: Glykokoll, Alanin, Leucin, α -Pyrrolidinkarbonsäure, Phenylalanin und Glutaminsäure. Tyrosin konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Asparaginsäure und Cystin sind sehr wahrscheinlich auch vorhanden.

Es ergibt sich aus diesen Resultaten, daß das « Thymushiston » dieselben Bausteine besitzt, wie die übrigen bis jetzt untersuchten Eiweißkörper. Der Gehalt an « Diaminosäuren » stellt die Histone zwischen die gewöhnlichen Eiweißkörper und die Protamine, welche, wie jüngst gezeigt wurde,³⁾ gleichfalls

¹⁾ A. Kossel und F. Kutscher. Diese Zeitschrift. Bd. XXXI. S. 188. 1900/1901.

²⁾ Emil Abderhalden. Diese Zeitschrift. Bd. XXXVII. S. 493. 1903.

³⁾ A. Kossel. Diese Zeitschrift. Bd. XL. S. 311. 1903;

Emil Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XLI. S. 55. 1904.

die Gruppe der Monoaminosäuren enthalten. Eine scharfe Abgrenzung der einstweilen künstlich nach zum Teil rein äußerlichen Merkmalen gesonderten Gruppen von Eiweißkörpern wird wahrscheinlich nicht vorhanden sein. Von den fast «Diaminosäure»-freien Körpern (Seide, Elastin) bis zu den Protaminen werden sich alle Übergänge vorfinden. Es vereinfachen diese Befunde die Vorstellung der Umwandlung der einzelnen Gruppen in andere.

Bezüglich des Ausgangsmateriales ist zu bemerken, daß die Darstellungsmethode keine Garantie für Einheitlichkeit bietet. Der Beweis, daß ein «Histon» im Sinne Kossels vorlag, lieferten außer der Gewinnung, welche genau nach Kossels Vorschrift¹⁾ erfolgte, die bekannten Reaktionen, und namentlich der hohe Gehalt an Diaminosäuren.

Experimenteller Teil.

Thymusdrüsen vom Kalb wurden, nachdem sie fein zerkleinert und etwa 24 St. im Schüttelapparat mit Wasser — auf 1 kg Drüse circa 2 l Wasser — geschüttelt worden waren, koliert, und die Flüssigkeit²⁾ mit Salzsäure bis zu einem Gehalt von 0,8% versetzt. Durch Zentrifugieren und Filtrieren bekommt man eine klare oder schwach opaleszierende Flüssigkeit, aus welcher das Histon durch Ammoniak als dichter, weißer Niederschlag gefällt wird. Dieser wurde mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen und durch Kochen mit Alkohol und Äther entfettet. Aus 1 kg Thymus erhält man 30—35 g Histon in Form eines weißen, feinen Pulvers. Biuret-, Millonsche und Xanthoproteinreaktion waren positiv, Reaktion nach Molisch negativ. Zur Hydrolyse wurden 150 g der trockenen Substanz mit der dreifachen Gewichtsmenge konzentrierter Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 übergossen und 12 St. bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann 6 St. am Rückflußkühler gekocht. Nachdem die Lösung im Vacuum zum dicken Sirup eingedampft worden war, wurde die Masse mit 1000 g absolutem Alkohol übergossen und

¹⁾ A. Kossel und F. Kutscher, l. c.

²⁾ Vgl. Kossel und Kutscher, l. c.; Lilienfeld, Diese Zeitschrift. Bd. XVIII. S. 473, 1894.

mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Um die Bildung der Ester zu vervollständigen, wurde diese Operation noch einmal wiederholt, und dann die Ester durch Zusatz von Äther, Kaliumkarbonat und sehr konzentrierter Natronlauge unter starker Kühlung in Freiheit gesetzt.

Die fraktionierte Destillation der Ester erfolgte zuerst bei einem Druck von 12 mm auf dem Wasserbade, dann bei einem Druck von 0,2–0,5 mm teils auf dem Wasser-, teils auf dem Ölbade, wobei sich folgende Fraktionen ergaben:

1. Fraktion	80°	(Temperatur des Wasserbades)	bei 12 mm Druck	11 g
2.	100°	»	»	30 »
3.	100–180°	»	Ölbades	15 »

Fraktion 1 (bis 80°).

Diese enthielt neben Alkohol und Äther Glykokoll (0,75 g) und Alanin (1,2 g). Zur Verseifung der Ester wurde die Fraktion mit Salzsäure auf dem Wasserbade eingedampft, in absolutem Alkohol aufgenommen und mit Salzsäuregas gesättigt. Nach Einimpfen eines Kriställchens von salzsaurem Glykokollester erfolgte nach mehrtägigem Stehen bei 0° Kristallisation.

Zur Analyse diente der salzsaure Glykokollester.

0,1915 g Substanz gaben	0,2396 g CO ₂	und	0,1230 g H ₂ O
Berechnet für C ₄ H ₁₀ NO ₂ Cl		Gefunden	
34,43% C und 7,18% H		34,12% C und 7,13% H.	

Der Alaninester wurde mittels Kaliumkarbonat und Natronlauge in Freiheit gesetzt und mit Wasser verseift. Der Schmelzpunkt war 293° (unkorr.).

0,1912 g Substanz gaben	0,2830 g CO ₂	und	0,1357 g H ₂ O
Berechnet für C ₃ H ₇ NO ₂		Gefunden	
40,45% C und 7,87% H		40,37% C und 7,88% H.	

Fraktion 2 (100°).

Die Ester dieser Fraktion wurden durch Kochen mit der fünffachen Menge Wasser verseift, und die Aminosäuren durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit absolutem Alkohol am Rückflußkühler ausgekocht, und durch Eindampfen der alkoholischen Lösung die α -Pyrrolidinkarbonsäure (2,2 g) gewonnen. Der in Alkohol unlösliche Teil enthielt Leucin (17,7 g) und Alanin (4,0 g).

Analysiert wurde das Kupfersalz des Leucins.

0.1902 g Substanz gaben 0.3111 g CO ₂ und 0.1249 g H ₂ O	
Berechnet für C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₄ Cu	Gefunden
44.49% C und 7.41% H	44.60% C und 7.29% H.

Die unreine Pyrrolidinkarbonsäure wurde in das Kupfersalz übergeführt, und das Salz der racemischen Verbindung von dem der aktiven Säure durch Alkohol getrennt.

Zur Analyse diente das bei 120° getrocknete Kupfersalz der racemischen Verbindung.

0.1985 g Substanz gaben 0.2969 g CO ₂ und 0.0974 g H ₂ O	
Berechnet für C ₁₀ H ₁₆ O ₄ N ₂ Cu	Gefunden
41.16% C und 5.49% H	40.79% C und 5.45% H.

Fraktion 3 (100—180°).

Das Estergemisch wurde mit der fünffachen Menge Wasser versetzt, dann mit dem gleichen Volumen Äther geschüttelt, wobei der Phenylalaninester in den Äther geht. Die Menge des isolierten Phenylalaninesters betrug 4 g. Derselbe wurde in das Hydrochlorat übergeführt, und dann das Phenylalanin durch wiederholtes Verdampfen mit überschüssigem Ammoniak in Freiheit gesetzt.

Der Zersetzungspunkt lag bei 280° (unkorr.).

0.1598 g Substanz gaben 0.3831 g CO ₂ und 0.0970 g H ₂ O	
Berechnet für C ₉ H ₁₁ NO ₂	Gefunden
65.45% C und 6.66% H	65.38% C und 6.78% H.

Die wässrige Lösung wurde mit Barythydrat verseift, der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ gefällt, das Filtrat eingedampft, und aus der konzentrierten Lösung die Glutaminsäure durch Einleiten von Salzsäuregas als Hydrochlorat abgeschieden.

Analysiert wurde das Hydrochlorat.

0.1866 g Substanz gaben 0.2229 g CO ₂ und 0.0939 g H ₂ O	
Berechnet für C ₅ H ₁₀ NO ₄ Cl	Gefunden
32.76% C und 5.47% H	32.58% C und 5.59% H
Die Ausbeute betrug 0.8 g.	

Die salzsaure Mutterlauge der Glutaminsäure wurde zur Entfernung der Mineralsäure mit Bleioxyd behandelt, und dann nach Entfernung des gelösten Bleis mit Kupferoxyd gekocht.

Schon in der Siedehitze schied sich eine geringe Menge eines Kupfersalzes aus, das nach seinem Aussehen höchstwahrscheinlich das Kupfersalz der Asparaginsäure war. Zur Analyse reichte die Menge nicht aus.

Zur Gewinnung des Tyrosins¹⁾ und des Cystins wurden 50 g trockenes Histon mit der dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt, dann die Flüssigkeit mit Natronlauge neutralisiert. Nach 24 Stunden wurde von dem entstandenen Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Salzsäure schwach angesäuert und mit Tierkohle entfärbt. Aus der klaren, schwachsauren Flüssigkeit schied sich bald ein reichlicher Niederschlag von Tyrosin ab.

Ausbeute 2,6 g.

0,1041 g Substanz gaben 0,2274 g CO ₂ und 0,0560 g H ₂ O	
Berechnet für C ₉ H ₁₁ NO ₃	Gefunden
59,66% C und 6,07% H	59,57% C und 5,97% H.

Die bei weiterem Einengen der schwachsauren Lösung ausgeschiedene Menge, die zum größten Teil aus Kochsalz bestand und keine Millonsche Reaktion mehr gab, wurde in 10% Ammoniak gelöst und mit Essigsäure angesäuert. Bei reichlichem Zusatz von Eisessig entstand ein feiner Niederschlag von Cystin, das mikroskopisch durch die charakteristischen sechsseitigen Tafeln und durch deutliche, wenn auch schwache, Bleireaktion identifiziert werden konnte. Für eine Analyse reichte die Menge nicht aus.

Die Gesamtmenge der isolierten Monoaminosäuren betrug für 150 g trockenes Histon

	In Gramm	In Prozenten
Glykokoll	0,75	0,50
Alanin	5,2	3,46
Leucin	17,7	11,80
α-Pyrrolidinkarbonsäure	2,2	1,46
Phenylalanin	3,3	2,20
Glutaminsäure	0,8	0,53
Ferner gaben 50 g Histon: Tyrosin	2,6	5,20
		25,15%

Zu diesen Zahlen ist zu bemerken, daß dieselben mit Ausnahme des Glykokolls und des Tyrosins nur Minimalzahlen

¹⁾ Vgl. Embden: Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, 1901, S. 94.

sind. Dies gilt besonders für die Glutaminsäure, welche bei direkter Bestimmung ohne Estermethode stets in bedeutend größerer Ausbeute erhalten wird. Kutscher¹⁾ gibt 3,66% an.

Die Bestimmung der Diaminosäuren, welche mit 50 g trockenem Histon nach Kossel ausgeführt wurde, ergab 1,5% Histidin, 15,5% Arginin und 6,9% Lysin. Da diese Verbindungen bereits von Kossel und Kutscher²⁾ genau bestimmt waren, wurden dieselben nur durch ihre Salze in bekannter Weise identifiziert.

¹⁾ F. Kutscher, l. c.

²⁾ A. Kossel und F. Kutscher, l. c.