

Über das Nucleohiston.

I. Mitteilung.

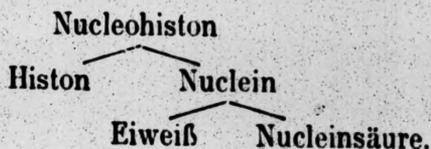
Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1913.)

Aus dem Wasserextrakt der fein zerhackten Thymusdrüsen ist von Lilienfeld¹⁾ durch Essigsäurefällung ein Niederschlag erhalten worden, der von ihm Nucleohiston genannt worden ist; da er in wiederholten Darstellungen Körper bekam, die immer die gleiche Zusammensetzung zeigten, so hielt er sich für durchaus berechtigt, den Niederschlag als einen charakteristischen Körper anzusehen und ihm einen besonderen Namen zu geben. Als Bestandteile des Nucleohistons konnten von Lilienfeld Nucleinsäure und Histon festgestellt werden, und da ein Teil des Histons sich leichter mit Salzsäure aus dem Nucleohiston extrahieren ließ als der übrige Eiweißanteil, so stellte er zur Illustration der Verhältnisse das ganz allgemein gehaltene Schema auf:



Gegen die Berechtigung eines solchen Schemas hat sieben Jahre später Bang²⁾ mehrere Einwände gemacht, die ich aber nicht hier, sondern erst am Schluß meiner Untersuchungen besprechen werde. Ferner haben sich Malengreau³⁾ und Huiskamp⁴⁾ mit den Eigenschaften des Nucleohistons beschäftigt; auch auf diese Arbeiten werde ich am Schluß zurückkommen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 473.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 508. — B. Ph. P., Bd. 4, S. 115. S. 331; Bd. 5, S. 317.

³⁾ La cellule, Bd. 17, S. 339; Bd. 19, S. 283; Bd. 21, S. 121.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 145; Bd. 34, S. 32; Bd. 39, S. 55.

Nachdem durch meine Untersuchungen wenigstens die eine Komponente des Nucleohistons, die Nucleinsäure, zu einem genau definierbaren Körper geworden war und es sich gezeigt hatte, daß sich mit ihrer Hilfe die Verhältnisse der äther-, alkohol- und wasserunlöslichen Substanzen des Kopfes der Spermatozoen von Fischen in einfacher und klarer Weise übersehen lassen, habe ich jetzt auch die Untersuchung der Substanzen des Zellkernes der Thymuszellen in Angriff genommen in der Hoffnung, auch hier zur Klärung der kompliziert erscheinenden und sehr strittigen Verhältnisse einiges beitragen zu können.

Die erste Aufgabe bestand naturgemäß darin, aller Einwände ungeachtet das alte Lilienfeldsche Nucleohiston, auf das sich ja auch die späteren Untersucher immer wieder beziehen, in größerer Menge darzustellen und den Anteil zu bestimmen, den die echte Nucleinsäure daran hat. War dies festgestellt, so ließen sich hieraus schon gewisse Schlüsse auf den noch verbleibenden Rest ziehen.

Es wurden also $10\frac{1}{2}$ \bar{n} Thymusdrüsen frisch aus dem Schlachthaus bezogen, rein präpariert, zerkleinert und die nunmehr verbleibenden 2850 g reiner Substanz mit 5850 ccm Wasser unter Zusatz von Toluol 4 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und über Nacht auf Eis gelegt. Dann wurde die Masse durch ein Haarsieb getrieben, mit 37 l Wasser verdünnt und zentrifugiert. Es resultierte eine hellgelbe, schwach opaleszierende Flüssigkeit und sehr wenig eines schleimigen Rückstandes. Die Lösung wurde nun vorsichtig mit Essigsäure ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, ausgeschleudert und mit essigsauerm Wasser ausgewaschen. Die schneeweiße Substanz wurde jetzt in 3—4 l Wasser, dem auf 800 H₂O 200 ccm 10%ige Na₂CO₃-Lösung hinzugefügt waren, aufgelöst, die Lösung auf 10 l verdünnt, über Seesand an der Saugpumpe von geringen schleimigen Rückständen abgesaugt, das Filtrat, das noch immer schwach opaleszierte, noch einmal mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und wieder mit Essigsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und wiederholt mit Alkohol und Äther ausgekocht. So wurden 165 g eines weißen, feinen, staubenden Pulvers erhalten.

Die Analysen dieser Substanz, zuerst bei 90° , dann bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet, ergaben folgende Resultate:

0,1275 g	neutralisieren	15,3 ccm	$n/10$ - H_2SO_4	=	16,85%	N (Kjeldahl).
0,1287	»	15,4	»	=	16,77%	»
0,1300	»	7,5	$n/2$ -NaOH	=	3,196%	P (Neumann).
0,1333	»	7,3	»	=	3,034%	»
0,1354	»	liefern 0,2402 g CO_2 u. 0,0837 g H_2O		=	48,38%	C u. 6,92% H_2O .
0,2614	»	mit Soda und Salpeter verascht, geben 0,0137 g $BaSO_4$		=	0,72%	S.

Vergleicht man mit diesen Zahlen die Durchschnittszahlen, die Lilienfeld gefunden hat, so ergibt sich eine überraschende Übereinstimmung.

Lilienfeld:	Von mir gefunden:
C = 48,46%	48,38%
H = 7,00%	6,92%
N = 16,86%	16,85% 16,77%
P = 3,025%	3,20% 3,03%
S = 0,701%	0,72%

Es kann also gar kein Zweifel bestehen, daß man, wenn man genau nach den Angaben Lilienfelds arbeitet, auch zu einem Körper kommt, der nach seiner elementaren Zusammensetzung dessen Angaben entspricht. Dabei bleibt natürlich die Frage, ob der Niederschlag ein einheitliches chemisches Individuum ist oder nicht, vorläufig gänzlich aus dem Spiel.

Um nun in diesem Nucleohiston den Anteil der echten Nucleinsäure zu bestimmen, wurden 50 g lufttrockener Substanz mit 500 ccm Wasser, dem 50 g Natriumacetat und 30 ccm 33% ige Natronlauge zugesetzt waren, 2 Stunden lang im Kolben im siedenden Wasserbade erwärmt. Während des Erhitzens und dann noch bis zum völligen Erkalten der Reaktionsflüssigkeit wurde ein langsamer Luftstrom durch die Lösung gesogen, der eine mit $n/10$ -Schwefelsäure beschickte Waschflasche passieren mußte. Das Nucleohiston ging während des Erwärmens sehr bald in Lösung, es blieben nur wenige Flocken ungelöst, die abfiltriert wurden, keine organische Substanz enthielten und bei der Veraschung nach Neumann 0,052 g P enthielten. Dieser Phosphor hat allem Anschein nach aus anorganischen Phosphaten gestammt, die noch das Nucleohiston begleitet haben, wenn man nicht annehmen will, daß durch das zwei-

stündige Erwärmen in alkalischer Lösung eine sehr geringe Menge Nucleinsäure aufgespalten sein sollte. Das ist aber nach anderen Versuchen nicht sehr wahrscheinlich.

Das übergegangene Ammoniak hatte 212,5 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ neutralisiert.

Die portweinrote klare Zersetzungsflüssigkeit wurde nun auf 1000 ccm aufgefüllt und dann ihr Stickstoff- und Phosphorgehalt bestimmt.

5 ccm sättigen	23,3 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$	(Kjeldahl).
5 „ „	23,2 „ „	„
5 „ „	10,7 „ $n/2\text{-NaOH}$	(Neumann).
5 „ „	10,6 „ „	„

Danach waren in der Lösung 6,496 g N und 1,185 g P enthalten. Rechnet man noch das überdestillierte Ammoniak und den Phosphor des Unlöslichen dazu (0,297 g N und 0,052 g P), so erhält man 6,793 g N und 1,237 g P, Zahlen, die mit den auf trockene Ausgangssubstanz (40,98 g) berechneten befriedigend übereinstimmen. Verlangt sind 6,889 g N und 1,277 g P.

In der Reaktionsflüssigkeit waren nur Spuren anorganischer Phosphorsäure noch vorhanden: 50 ccm, mit Essigsäure angesäuert, mit Ammoniak alkalisch gemacht, gaben mit Magnesiummischung nur Spuren eines Niederschlages. Dagegen war in der Flüssigkeit noch Ammoniak vorhanden: 50 ccm, mit Schwefelsäure angesäuert, mit Baryt genau neutralisiert, gaben mit überschüssigem BaCO_3 , im Wasserdampfstrom destilliert, NH_3 , das einmal 4,3 ccm, das andere mal 3,3 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ neutralisierte = 0,1064 g N.

Der Rest der Reaktionsflüssigkeit wurde nunmehr mit Essigsäure ganz schwach angesäuert; dabei entstand ein geringer Niederschlag, der abfiltriert und in verdünnter Natronlauge gelöst auf 250 ccm aufgefüllt wurde.

20 ccm neutralisieren 4,7 ccm $n/2\text{-NaOH}$ (Neumann) = 0,0026 g P.

5 „ „ 2,6 „ $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ (Kjeldahl) = 0,0036 „ N.

Der Niederschlag hatte also 0,18 g N und 0,032 g P enthalten.

Das schwach essigsäure Filtrat wurde jetzt auf ca. 150 ccm eingengt, mit ca. 300 ccm 96 % Alkohol ausgefüllt, der Niederschlag von der Flüssigkeit getrennt, in heißem Wasser

gelöst, von wenigem Ungelösten abfiltriert und mit Alkohol wieder gefällt. Die Fällung wurde mit absolutem Alkohol getrocknet und lieferte lufttrocken 11,4 g eines feinen weißen staubenden Pulvers.

0,1105 g neutralisieren	9,7 ccm $n_{/10}$ -H ₂ SO ₄	= 12,30% N (Kjeldahl).
0,1042 „	9,4 „	= 12,64% „
0,1042 „	14,0 „ $n_{/2}$ -NaOH	= 7,44% P (Neumann).
0,1033 „	14,4 „	= 7,72% „

Im Durchschnitt enthielt das Präparat also 7,58% P und 12,47% N, das ist ein Verhältnis von P : N = 1 : 1,645. Verlangt ist für nucleinsaures Natron 1 : 1,69.

Im Filtrat von der Nucleinsäurefällung, dem die Mutterlauge der Umfällung zugefügt worden war und das auf 500 ccm aufgefüllt wurde, fanden sich noch 0,073 g P und 3,283 g N.

25 ccm neutralisieren	6,7 ccm $n_{/2}$ -NaOH	= 0,0037 g P (Neumann).
25 „	6,5 „	= 0,0036 „
5 „	23,4 „ $n_{/10}$ -H ₂ SO ₄	= 0,03276 „ N (Kjeldahl).
5 „	23,5 „	= 0,03290 „

Stellt man die Analysenresultate noch einmal, auf 1000 ccm Ausgangslösung berechnet, übersichtlich zusammen, so ergibt sich:

In der zu untersuchenden Lösung waren 1,185 g P und 6,496 g N.

Wiedergefunden sind:

1. im Essigsäureniederschlag:	0,039 g P und 0,220 g N
2. „ Nucleinsäureniederschlag:	1,041 „ „ „ 1,713 „ „
3. „ Restfiltrat:	0,088 „ „ „ 3,955 „ „

Zusammen:	1,168 g P und 5,888 g N
Verlust:	0,017 „ „ „ 0,608 „ „

Wenn man die vielen Filtrationen und Ablesungen berücksichtigt, kann man wohl das Resultat der P-Bestimmungen als gut, das der N-Bestimmungen als befriedigend bezeichnen.

Die Zahlen geben auf die im Anfange aufgeworfene Frage nach dem Anteil der echten Nucleinsäure im Nucleohiston eine ganz eindeutige Frage: außer Spuren von anorganischen Phosphaten kommt im Nucleohiston nur die echte Nucleinsäure vor: es sind nach dem P-Gehalt (wenn man die anorganischen Phosphate abzieht) verlangt 16,3 g lufttrockenes nucleinsaures Natron mit dem früher von mir gefundenen Wert 7,27% P. Rechnet man das Analysenresultat: 11,4 g Substanz mit 7,58% P in 830 ccm Lösung auf die obige Substanz und 1000 ccm um,

so erhält man als Ausbeute: 14,32 g, während der Rest im Filtrat in Lösung geblieben ist, respektive bei den vielen Operationen verloren ging.

Zur Stützung der Resultate habe ich noch einen zweiten Versuch in gleicher Weise angestellt. Es wurden wiederum 50 g lufttrockene Substanz mit 500 ccm Wasser, 50 g Natriumacetat und 30 ccm 33% Natronlauge angesetzt und 1 Stunde im siedenden Wasserbade gehalten, während ein langsamer Luftstrom durch die Flüssigkeit strich, der eine Waschflasche mit $\frac{1}{2}$ Normalschwefelsäure passieren mußte. Es wurden 36,8 ccm neutralisiert = 0,2576 g N. Dann wurde die rötliche Zersetzungsflüssigkeit filtriert und auf 1000 aufgefüllt. Der dabei verbleibende Niederschlag enthielt 0,0212 g P. Die Lösung selbst enthielt 6,552 g N und 1,18 g P.

5 ccm neutralisieren 23,3 ccm n_{10} -H₂SO₄ (Kjeldahl).

5 „ „ 23,5 „ „ „

5 „ „ 10,6 „ $n_{\frac{1}{2}}$ -NaOH (Neumann).

5 „ „ 10,7 „ „ „

Mit Magnesiamixtur erschien in 50 ccm der Lösung, mit Essigsäure angesäuert und mit Ammoniak alkalisch gemacht, nur eine Spur eines Niederschlages.

Der beim Zusatz von Essigsäure zur Zersetzungsflüssigkeit entstehende Niederschlag enthielt 0,06 g P und 0,312 g N.

Er wurde in NaOH aufgelöst, auf 250 ccm aufgefüllt:

10 ccm neutralisieren 8,9 ccm n_{10} -H₂SO₄ (Kjeldahl).

10 „ „ 8,9 „ „ „

10 „ „ 4,3 „ $n_{\frac{1}{2}}$ -NaOH (Neumann).

10 „ „ 4,4 „ „ „

Die Ausbeute an lufttrockenem nucleinsauren Natron betrug 11,5 g mit 7,74% P und 13,01% N. Das Verhältnis von P : N ist: 1,679; verlangt: 1 : 1,69.

0,1159 g neutralisieren 16,2 ccm $n_{\frac{1}{2}}$ -NaOH (Neumann).

0,1248 „ „ 11,6 „ n_{10} -H₂SO₄ (Kjeldahl).

Im Endfiltrat (auf 500 ccm gebracht) waren noch 3,086 g N und 0,0676 g P enthalten:

25 ccm neutralisieren 6,2 ccm $n_{\frac{1}{2}}$ -NaOH (Neumann).

25 „ „ 6,0 „ „ „

5 „ „ 22,2 „ n_{10} -H₂SO₄ (Kjeldahl).

5 „ „ 22,1 „ „ „

Auf 1000 ccm Ausgangsflüssigkeit wie oben berechnet, ergibt sich folgende Übersicht:

1. im Essigsäureniederschlag:	0,072 g P und 0,376 g N
1. › Nucleinsäureniederschlag:	1,072 › › › 1,801 › ›
2. › Restfiltrat:	0,081 › › › 3,736 › ›

Zusammen: 1,225 g P und 5,913 g N

In der Ausgangslösung waren: 1,18 › › › 6,552 › ›

Die Ausbeute an nucleinsaurem Natron (bezogen auf 7,27% P und auf 1000 ccm) betrug 14,75 g statt der verlangten 16,3 g.

Dieser zweite Versuch hat also fast die gleichen Zahlen geliefert wie der erste: beide Versuche ergeben keinen Grund, außer der echten Nucleinsäure noch eine andere Nucleinsäure im Nucleohiston anzunehmen. Wenn wirklich einmal stark von den verlangten abweichende Zahlen für die Nucleinsäure gefunden werden, so hat das wohl meist seinen Grund darin, daß bei den analytischen Manipulationen (gewöhnlich durch zu starkes Ansäuern mit Essigsäure während des Einengens) sich ein Teil der Nucleinsäure zersetzt hat; ich verfüge wenigstens über einige Versuche, bei denen sich im Filtrat der Nucleinsäurefällung reichliche Niederschläge mit ammoniakalischer Silberlösung fanden und in denen natürlich das Verhältnis P : N in der Nucleinsäurefällung nicht dem verlangten entsprach.

Ist aber außer der Nucleinsäure keine andere P-haltige Komponente im Nucleohiston vorhanden, so muß sich auch — ganz analog wie bei meinen Analysen am Spermatozoonkopf der Fische — der Anteil des Eiweißes ohne weiteres feststellen lassen.

Derartige Untersuchungen werde ich in Kürze mitteilen.

Zu den Untersuchungen, die besonders wegen des Ausgangsmaterials recht kostspielig sind, hat mir das Kuratorium der Bostestiftung eine Unterstützung bewilligt, für die ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank sage.