

Über das Nucleohiston.

II. Mitteilung.¹⁾

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. März 1914.)

Während der Nachweis, daß im «Nucleohiston» Liliensfelds sämtlicher Phosphor in Form der echten Nucleinsäure vorkommt, verhältnismäßig leicht zu führen ist, stößt die genauere Bestimmung des 'Eiweißanteils' auf größere Schwierigkeiten. Diese sind erstens darin begründet, daß die Niederschläge, die man als Nucleohiston bezeichnet, je nach der Darstellungsmethode eine wechselnde Zusammensetzung haben und nur dann dem von Liliensfeld untersuchten Präparat entsprechen, wenn man sich sehr genau an seine Vorschriften hält. Schon die kleinsten, scheinbar nebensächlichen Modifikationen bedingen andere analytische Werte des Niederschlags. Zweitens ist der Begriff des Histons aus Nucleohiston nicht mit derjenigen Bestimmtheit festgelegt, wie etwa der des Protamins aus den verschiedenen Fischspermien. Überblickt man die in der Literatur vorliegenden speziellen Angaben über das Thymushiston, so fallen einem sofort die oft ganz entgegengesetzten Beobachtungen der verschiedenen Autoren über das Verhalten des Histons auf und man kann sich des Zweifels nicht erwehren, ob die einzelnen Forscher auch wirklich ein und dieselbe Substanz in Händen gehabt haben, zumal man im Vergleich zu den vielen Beschreibungen über das qualitative Verhalten der Substanzen nur verhältnismäßig wenige quantitative analytische Angaben findet. Um bei der vorläufig noch bestehenden Unsicherheit wenigstens zu einigermaßen brauchbaren und exakten Resultaten zu gelangen, habe ich

¹⁾ I. Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 207.

mich an die Angaben von Kossel und Kutscher¹⁾ gehalten, nach denen das Thymushiston 14,36% Arginin enthält. Auf Grund dieser Tatsache war es möglich, durch eine quantitative Argininbestimmung im Nucleohiston den Anteil des Histons festzustellen. Diese Menge Histon muß derjenigen Menge entsprechen, die man aus dem Nucleohiston nach Abzug der Nucleinsäure erhält, vorausgesetzt, daß das Nucleohiston nur Nucleinsäure und Histon enthält.

Zweitens konnte man erwarten, durch quantitative Bestimmung des mit Salzsäure ausziehbaren Anteiles Aufschlüsse über die Menge des Histons zu erhalten und drittens ließen sich die erhaltenen Resultate dadurch kontrollieren, daß durch Zusammenbringen von nucleinsaurem Natron mit der berechneten Menge eines Histonsalzes ein Niederschlag erzeugt wurde. Dieser mußte in seiner Zusammensetzung und in seinem Verhalten dem reinen Nucleohiston gleichen, wenn dieses wirklich gleichfalls ein Salz der Nucleinsäure und des Histons ist.

Was zunächst die Darstellung des Nucleohistons betrifft, so liegt offenbar die größte Schwierigkeit in der Ausschließung sekundärer Fermentwirkungen während der Verarbeitung der Thymusdrüsen. Wässerige Extrakte der Thymusdrüse, bei Zimmertemperatur und tagelang aufbewahrt, zeigen natürlich lebhaft enzymatische Vorgänge, die sich mit Sicherheit bei Darstellungen im großen garnicht beherrschen lassen. Ich habe die Fermentwirkungen möglichst durch rasches Arbeiten bei niederen Temperaturen und in nicht zu großen Mengen zu vermeiden gesucht, aber die nur träge filtrierenden Flüssigkeiten ziehen der Schnelligkeit des Arbeitens eine enge Grenze.

Da man nun bei der Extraktion der Thymusdrüsen mit Wasser meist zu stark getrüben Auszügen, im günstigsten Falle zu stark opaleszierenden Extrakten kommt, die sich durch keine Filtration vollkommen klären lassen, so habe ich in der Annahme, daß diese Trübung möglicherweise durch feinste Fetttropfchen bedingt sein könnte, eine Reinigung der Extrakte durch vorsichtiges Schütteln mit Äther versucht. Man erhält dann vollkommen klare Filtrate, aus denen mit

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 31, S. 191.

Essigsäure ein schneeweißer Niederschlag ausfällt, der sich ohne Opalescenz wieder in schwacher Sodalösung auflöst. Der Einfluß dieses doch gewiß ganz harmlosen Eingriffs zeigt sich in den Analysen der folgenden Präparate. — Die Substanzen waren mit Alkohol und Äther je dreimal ausgekocht, dann für die Analyse bei 90—110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Präparat B:

0,1369 g	sättigen	16,2 ccm	n_{10} -Säure	=	16,58%	N (Kjeldahl).
0,1336	»	15,8	»	=	16,57%	» (»).
0,1352	»	9,3	n_{10} -Lauge	=	3,81%	P (Neumann).
0,1354	»	10,3	»	=	4,21%	» (»).
0,1325	»	gaben 0,2250 g CO ₂ und 0,0794 g H ₂ O		=	46,31%	C und 6,70% H.
0,1358	»	0,2330	»	=	46,78%	» 7,00% »

Präparat C (auf gleiche Weise wie B dargestellt):

0,1315 g	sättigen	15,6 ccm	n_{10} -Säure	=	16,61%	N (Kjeldahl).
0,1238	»	14,8	»	=	16,75%	» (»).
0,1386	»	12,0	n_{10} -Lauge	=	4,80%	P (Neumann).
0,1237	»	10,9	»	=	4,88%	» (»).
0,1262	»	gaben 0,1876 g CO ₂ und 0,0789 g H ₂ O		=	40,54%	C und 6,99% H.

Um den Einfluß des Ausätherns auf die Zusammensetzung des Präparates noch genauer kennen zu lernen, wurde bei einer Verarbeitung von 2255 g Thymusdrüsen ein Teil des wässerigen Auszuges ausgeäthert, der andere Teil ohne Ätherextraktion verarbeitet.

Der extrahierte Teil gab (bei 90—110° getrocknet) folgende Zahlen:

Präparat D₁:

0,1350 g	sättigen	16,2 ccm	n_{10} -Säure	=	16,81%	N (Kjeldahl).
0,1343	»	16,3	»	=	17,00%	» (»).
0,1360	»	11,9	n_{10} -Lauge	=	4,85%	P (Neumann).
0,1391	»	12,3	»	=	4,90%	» (»).
0,1330	»	gaben 0,1952 g CO ₂ und 0,0810 g H ₂ O		=	40,03%	C und 6,81% H.

Dagegen gab der nicht mit Äther extrahierte Teil folgende Werte:

Präparat D₂ (bei 90—110° getrocknet):

0,1460 g	sättigen	17,2 ccm	n_{10} -Säure	=	16,51%	N (Kjeldahl).
0,1475	»	17,4	»	=	16,53%	» (»).
0,1460	»	8,4	n_{10} -Lauge	=	3,19%	P (Neumann).
0,1446	»	8,6	»	=	3,29%	» (»).
0,1442	»	gaben 0,2618 g CO ₂ und 0,0919 g H ₂ O		=	49,52%	C und 7,13% H.
0,1457	»	0,2646	»	=	49,53%	» 7,04% »

Gegenüberegestellt zeigen die Zahlen wohl deutlich einen Einfluß des Ausätherns, der sich in einer Zunahme des Phosphor- und einer Abnahme des Kohlenstoffgehaltes kundgibt. Man muß sich also vorstellen, daß durch den Äther der wässerigen Lösung ein Körper, wahrscheinlich Fett, entzogen wird, der die Opalescenz verursacht und bei der gewöhnlichen Darstellungsmethode durch die Essigsäurefällung mitgerissen wird und sich dann nur schwer wieder aus dem Niederschlage extrahieren läßt.

	Nicht ausgeäthert				Ausgeäthert					
	A ¹⁾		D ₂		B		C		D ₁	
C	48,38	—	49,53	49,52	—	—	40,54	—	40,03	—
H	6,62	—	7,04	7,13	—	—	6,99	—	6,81	—
N	16,85	16,77	16,51	16,53	16,58	16,57	16,61	16,75	16,81	17,00
P	3,20	3,03	3,19	3,29	3,81	4,21	4,80	4,88	4,85	4,90

Auf Grund der Darstellungsmethode müssen die Präparate B, C und D₁ als reiner angesehen werden wie A und D₂; ob sie aber wirklich chemisch reine und einheitliche Substanzen sind, muß vorläufig in Ermangelung irgend eines Kriteriums der Reinheit dahingestellt bleiben.

Eine genauere Analyse der Substanzen ist nur mit Hilfe unserer Kenntnisse von der Nucleinsäure möglich. Legt man einen durchschnittlichen P-Gehalt von 4,86% (nach Präparat C und D₁ berechnet) den Berechnungen zugrunde, so ergibt sich daraus ein Gehalt von 57% Nucleinsäure und demnach von 43% Histon. Dieses Histon müßte noch 8,55 g Stickstoff enthalten, da für die Nucleinsäure 8,24 g N nötig sind (Durchschnitts-N-Gehalt des Nucleohistons 16,79%). Hieraus würde sich ein Prozentgehalt von 19,88% N für das Histon ergeben, während z. B. von Bang²⁾ im Mittel 18,10%, von Fleroff 18,35%³⁾ gefunden sind. Die Übereinstimmung ist also nicht sehr genau und ich habe versucht, zunächst durch quantitative Argininbestimmungen im Nucleohiston weitere experimentelle Grundlagen für die Anschauungen über das Nucleohiston zu

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 207.

²⁾ Beiträge z. chem. Physiol., Bd. 4, S. 335.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 28, S. 307.

gewinnen. Da das Histon aus Thymus nach den Angaben von Kossel und Kutscher 25,17% seines Stickstoffs in Form von Arginin enthält, so läßt sich leicht berechnen, daß 100 g Nucleohiston 6,69 g Arginin liefern müssen (nach dem N-Gehalt berechnet), immer vorausgesetzt, daß nur Histon als Eiweißkomponente des Nucleohistons in Frage kommt.

Argininbestimmung im Nucleohiston.

27 g des luftrocknen Präparates C. werden mit 40,5 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 162 ccm Wasser 16 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Lösung von geringen Mengen Ungelöstem getrennt und auf 500 ccm gebracht, sie enthielt dann 3,962 g N und 1,19 g P.

5 ccm sättigen 28,3 ccm n_{10} -Säure = 0,03962 g N (Kjeldahl).

5 „ „ 28,3 „ „ = 0,03962 „ „ („ „).

5 „ „ 21,4 „ $n_{1/2}$ -Lauge = 0,01186 g P (Neumann).

5 „ „ 20,2 „ „ = 0,01191 „ „ („ „).

Nunmehr wurde in bekannter Weise eine quantitative Argininbestimmung in der Flüssigkeit ausgeführt und die endlich erhaltene Argininfraktion, auf 100 ccm aufgefüllt, ergab einen N-Gehalt von 0,3248 g, demnach 1,009 g Arginin. Durch Fällung mit Pikrolonsäure wurden 2,65 g Argininpikrolonat = 1,011 g Arginin erhalten.

In einem zweiten Versuch wurden 50 g des lufttrockenen Präparates D₂ mit 75 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 300 g Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die auf 1000 ccm aufgefüllte Lösung enthielt dann 0,7742 g N.

5 ccm sättigen 27,6 ccm n_{10} -Säure = 0,03864 g N (Kjeldahl).

5 „ „ 27,7 „ „ = 0,03878 „ „ („ „).

In der Argininfraktion fanden sich, aus dem N-Gehalt berechnet, 2,33 g Arginin, aus dem Pikrolonat bestimmt 2,39 g.

Anstatt der nach dem N-Gehalt des Nucleohistons verlangten Menge von 6,69% Arginin sind im ersten Versuch 4,26% Arginin (auf trockenes Ausgangsmaterial bezogen) gefunden, das würde auf Histon umgerechnet (Histon = 14,36% Arginin) einer Menge von 30 g Histon entsprechen, es ergibt

sich also eine Wenigerausbeute von 2,43 g Arginin oder 13 g Histon, auf 100 g Nucleohiston bezogen.

Der zweite Versuch hat eine Ausbeute von 5,04% Arginin ergeben (auf trockene Ausgangssubstanz bezogen). Hier zeigt sich deutlich, von welchem großem Einfluß der Phosphorgehalt des Präparats auf die Berechnung ist, denn aus dem Phosphorwert ergibt sich nur ein Gehalt von 38% Nucleinsäure, dem 62% Histon entsprechen müßten. Da für 38 g Nucleinsäure 5,49 g Stickstoff verlangt sind, bleiben für das Histon 11,03 g N (das Präparat D₂ hat 16,52%), aus dem 8,64 g Arginin hervorgehen müßten. Die Ausbeute von 5,04% Arginin bedeutet ein Wenigerergebnis von 3,6 g Arginin, auf 100 g Nucleohiston bezogen.

Die Differenzen sind, wenn man bedenkt, daß die Argininbestimmung eine recht genaue Methode ist, erheblich und sprechen dafür, daß außer Nucleinsäure und Histon in den von mir untersuchten Präparaten noch ein anderer argininärmer Eiweißkörper in wechselnder Menge vorhanden gewesen ist.

Zu einem wenig befriedigenden Resultat kommt man ferner, wenn man die Menge Histon quantitativ zu bestimmen versucht, die man durch Salzsäureextraktion aus dem Nucleohiston erhalten kann. Wie oben angegeben, läßt sich aus dem Phosphorgehalt des Nucleohistons leicht der «Histon»gehalt berechnen, z. B. in Präparat C und D₁ 43%.

Histonbestimmung im Nucleohiston.

30 g Nucleohiston (Präparat A. Analysen Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 209) werden dreimal je eine halbe Stunde mit 500 ccm 0,8%iger Salzsäure geschüttelt und aus den schwach opaleszierenden Filtraten das Histon durch Zusatz von Ammoniak ausgefällt.¹⁾ Aus dem dritten Extrakt wurden nur noch 0,75 g Substanz (lufttrocken) erhalten. Gesamtausbeute lufttrocken: 5,45 g.

Bei 90—110° getrocknet lieferte die Analyse folgendes Resultat:

¹⁾ Kossel u. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. 31, S. 188.

0,1320 g sättigen 16,6 ccm n_{10} -Säure = 17,62% N (Kjeldahl).
 0,1289 „ „ 15,8 „ „ = 17,18% „ („ „).
 0,1312 „ gaben, mit Soda und Salpeter verbrannt 0,0087 g BaSO_4 = 0,91% S.
 0,1263 „ „ „ „ „ „ „ 0,0135 „ „ = 1,47% „

Ein zweiter Versuch ergab folgendes:

30 g Nucleohiston (Präparat B) wie oben behandelt, ergab als Ausbeute der Ammoniakfällung 1,05 g (lufttrocken). Aus dem Filtrat der Ammoniakfällung fielen auf Zusatz von etwa $\frac{1}{3}$ Volumen 96%igen Alkohols noch weiter 1,35 g.

Analyse der NH_3 -Fällung (mit Alkohol und Äther ausgekocht und bei 90—110° getrocknet):

0,1414 g sättigen 17,2 ccm n_{10} -Säure = 17,04% N (Kjeldahl).
 0,1451 „ „ 17,5 „ „ = 16,90% „ („ „).

Analyse der Alkoholfällung:

0,1373 g sättigen 16,2 ccm n_{10} -Säure = 16,52% N (Kjeldahl).
 0,1373 „ „ 15,9 „ „ = 16,22% „ („ „).

Ein dritter Versuch verlief ganz ähnlich:

25 g (Präparat D₁) werden in gleicher Weise wie in den vorigen Versuchen behandelt. Ausbeute lufttrocken 5,42 g.

Analysen der Substanz (bei 90—110° getrocknet):

0,1048 g sättigen 12,8 ccm n_{10} -Säure = 17,11% N.
 0,1004 „ „ 12,2 „ „ = 17,03% „

Stellt man die berechneten und gefundenen Werte in runden Zahlen einander gegenüber, so ergibt sich:

	Berechnet:	Gefunden:
für Versuch I	63% Histon	18%
„ „ II	47% „	3,5%
„ „ III	43% „	22%

Diese geringen Ausbeuten an Histon stehen durchaus in Einklang mit den Angaben älterer Autoren, sie entsprechen den Verhältnissen bei den Fischspermien, aus denen sich ebenfalls nicht die Gesamtmenge von Protamin mit Salzsäure ausziehen läßt. Auffallen muß aber in allen drei Versuchen der gleichmäßig niedrige Stickstoffgehalt des gewonnenen «Histons», der eher dem N-Gehalte des Parahistons 17,84% N entspricht. Um einen Einblick in die Vorgänge bei der Salzsäureextraktion zu gewinnen, habe ich künstlich neutrales nucleinsaures Histon

erzeugt und dieses mit Salzsäure unter den gleichen Bedingungen wie oben extrahiert.

Das für diesen Zweck benutzte Histonsulfat wurde durch Auflösen von Histon in sehr verdünnter Schwefelsäure gewonnen und mit Alkohol ausgefällt. Das lufttrockene Präparat gab folgende Werte:

0,1501 g	sättigen	11,2 ccm	n_{10} -Säure	=	10,46%	N (Kjeldahl).
0,1511	»	10,8	»	=	10,02%	» (») .
0,1527	»	gaben 0,0370 g BaSO_4		=	10,18%	H_2SO_4 .
0,1549	»	0,0375	»	=	10,17%	»

Das Präparat von nucleinsaurem Natron enthielt lufttrocken 5,40% Na, demnach entsprechen 8,537 g nucleinsaurem Natron 9,634 g Histon. Es wurden also 7,62 g nucleinsaures Natron in 200 ccm warmen Wassers gelöst und ferner 8,6 g Histon-sulfat in 300 ccm Wasser, beide absolut klaren Lösungen wurden dann zusammengegossen, es entstand ein flockiger, weißer Niederschlag, der mit absolutem Alkohol und Äther getrocknet 11,4 g wog.

Die bei 100—110° getrocknete Substanz enthält:

0,1442 g	sättigen	16,8 ccm	n_{10} -Säure	=	16,32%	N (Kjeldahl).
0,1340	»	15,5	»	=	16,21%	» (») .
0,1286	»	12,1	» $n_{1/2}$ -Lauge	=	5,21%	P (Neumann).
0,1294	»	11,5	»	=	4,92%	» (») .
0,4937	»	gaben mit Soda u. Salpeter verbrannt,		0,0191 g BaSO_4	=	0,5312% S.

Das Präparat entspricht in seinem Verhältnis P:N annähernd meinem reineren Präparat des Nucleohistons.

P : N im nucleinsauren Histon	=	1 : 3,21.
P : N » Präparat C	=	1 : 3,44.
P : N » » A nach Lilienfeld	=	1 : 5,397.
P : N in einem freilich anders gewonnenen Präparat von Bang ¹⁾		(5,23% P, 16,87% N) = 1 : 3,226.

In diesem nucleinsauren Histon wurde nun gleichfalls durch Salzsäureextraktion das «Histon» bestimmt.

9,73 g wurden dreimal mit je 350 ccm 0,8%iger HCl eine halbe Stunde geschüttelt und die klar filtrierten Auszüge mit Ammoniak gefällt. Ausbeute an lufttrockenem Histon 1,61 g.

Anstatt der berechneten 41% Histon sind also auch hier nur 16,5% wiedergefunden, trotzdem es sich hier zweifellos um ein Salz der Nucleinsäure und des Histons handelt.

¹⁾ Beiträge z. chem. Physiol., Bd. 4, S. 137.

Nach diesem Ergebnis muß man sich den Vorgang bei der Extraktion wohl so vorstellen, daß durch die Behandlung des Nucleohistons mit verdünnter Salzsäure aus dem ursprünglich neutralen Salz ein saures Salz der Nucleinsäure mit dem Histon gebildet wird und nur die hierbei frei werdende geringe Menge Histon in Lösung geht.

Das künstlich hergestellte nucleinsaure Protamin verhält sich anders. Hier kann man durch Salzsäureextraktion fast alles Protamin wieder bekommen. Es wurde z. B. aus nucleinsaurem Natron und Clupeinsulfat neutrales nucleinsaures Clupein gewonnen, das, lufttrocken analysiert, folgende Werte gab:

0,1575 g	sättigen	19,5 ccm	$\frac{1}{10}$ -Säure	=	17,35%	N (Kjeldahl).
0,1500	„	18,8	„	=	17,56%	„ („ „).
0,1523	„	15,4	„ ₂ -Lauge	=	5,60%	„ (Neumann).
0,1549	„	16,8	„	=	6,01%	„ („ „).

Das Präparat enthielt im Durchschnitt also 5,80% P und 17,45% N, das Verhältnis P:N ist gleich 1:3,01. Früher ist von mir in einem anderen Präparat 1:3,211 gefunden worden, in den Spermaköpfen 1:3,237.¹⁾

18,69 g dieser Substanz wurden dreimal je eine Viertelstunde mit 100 ccm 1%iger H_2SO_4 extrahiert und aus den Extrakten wurden 5,10 g Protaminsulfat (über das Pikrat gereinigt) gewonnen. Hier sind also 21,9% Protamin wieder gefunden statt der verlangten 26,5%:²⁾ Das ist eine erheblich bessere Ausbeute wie bei dem nucleinsauren Histon.

Überblickt man noch einmal die ganze Versuchsreihe, so kommt man zu dem Resultat, daß sich die chemischen Ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 74.

²⁾ Herr Aristides Kanitz hat sich (Ergänzungsband zum Handbuch der Biochemie, S. 111) der dankenswerten Arbeit unterzogen, und die Zahlen in meinen Arbeiten über die Histochemie der Spermatozoen*) nachgerechnet. Er macht dabei auf einen Rechenfehler aufmerksam, der mir leider unterlaufen ist. Nach der richtigen Berechnung beträgt die Ausbeute an Arginin, die ich irrümlicherweise zu 21,6 g bei der Säurespaltung der Spermaköpfe angegeben hatte, 22,6 g, sodaß sich daraus ein Protaminwert von 25,4 g ableiten läßt. Die Übereinstimmung mit der theoretisch verlangten Menge (26,5 g) ist also tatsächlich besser, wie ich berechnet hatte.

*) Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 305; Bd. 73, S. 471; Bd. 83, S. 72.

hältnisse in den Kernen der Tymusdrüse noch nicht mit der gleichen Exaktheit formulieren lassen wie bei den Fischspermien. Die verschiedenen Präparate von Nucleohiston zeigen je nach der Darstellungsmethode wechselnde Zusammensetzung und eine genaue Analyse der einzelnen Produkte ist nicht ohne weiteres möglich, weil unsere Kenntnisse der in Frage kommenden Eiweißkörper noch zu mangelhaft sind. Bei der Ausfällung des Nucleohistons aus dem Wasserextrakt der Thymusdrüse schlägt die Nucleinsäure eine Reihe basischer Eiweißkörper in wechselnder Menge mit nieder und die Zusammensetzung dieser Eiweißkörper ist gewiß in hohem Maße von dem Grade enzymatischer Vorgänge in dem Wasserextrakt bedingt. Ich zweifle durchaus nicht daran, daß man unter bestimmten Bedingungen Produkte von der Zusammensetzung des nucleinsauren Histons bekommen kann, aber das ist nicht die Regel. Für gewöhnlich wird man mehr oder weniger komplizierte Gemenge bekommen. Daß man selbst einen so gut untersuchten Körper wie das Histon, dessen Gewinnung relativ so einfach ist — Salzsäureextraktion der Thymusdrüse und Ammoniakfällung im Filtrat — nicht immer in der gewünschten Reinheit bekommt, zeigen deutlich meine Versuche zur Bestimmung des Histons im Nucleohiston.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Gräfin Bosestiftung ausgeführt.
