

202. Chemische und biologische Untersuchungen über ein Hämosensitin aus *Mycobacterium tuberculosis*

von E. Sorkin, S. V. Boyden und J. M. Rhodes.

(27. VII. 56.)

Im Laufe unserer Untersuchungen über die durch Tuberkuloseinfektion und Tuberkuloseschutzimpfung beim Wirtsorganismus hervorgerufenen Immunitätsvorgänge interessierten wir uns für die chemische Natur des für den *Middlebrook-Dubos*-Hämagglutinationstest¹⁾ verantwortlichen Antigens. Die Bedeutung dieses Testes als Hilfe bei der Prognose und Diagnose der Tuberkulose ist sehr umstritten. Eine der Ursachen der widersprüchlichen Ergebnisse ist möglicherweise die unterschiedliche Spezifität der verschiedenen für diesen Test verwandten Antigenfraktionen. In weitem Umfang haben die verschiedenen Untersucher für die Sensibilierung der Erythrozyten verschiedenes Ausgangsmaterial benutzt, z. B. eine Polysaccharidfraktion aus extrahierten Tuberkelbazillen, Alt-Tuberkulin oder PPD, und Polysaccharidfraktionen aus Kulturfiltraten¹⁻⁵⁾.

*Middlebrook & Dubos*¹⁾ haben wahrscheinlich gemacht, dass die Erythrozyten sensibilisierende Substanz eine aus Polysaccharid aufgebaute Substanz sei, für die dann der Name „Hämosensitin“ vorgeschlagen wurde⁶⁾. Eine Ausweitung dieser Befunde ist von *Middlebrook*⁷⁾ erbracht worden, der Hämosensitin-Präparate mit einem Polysaccharid-Gehalt von 90–99% serologisch untersuchte. Analytische Einzelheiten wurden leider nicht mitgeteilt; auch wurde von *Middlebrook* die Homogenität dieser Präparate angezweifelt.

Von *Bretey* und Mitarb.⁸⁾ ist dann die Herstellung eines im *Middlebrook-Dubos*-Test aktiven sensibilisierenden Präparates aus Kulturfiltraten des Tuberkelbazillus beschrieben worden. Durch Fällung mit Salicylsäure wurde ein Protein-Polysaccharid-Komplex isoliert. Bei weiterer Behandlung mit 90-proz. Phenol verblieb ein Phenol-unlöslicher Polysaccharid-Rückstand, während ein Protein-

¹⁾ G. *Middlebrook & R. J. Dubos*, J. exp. Med. **88**, 521 (1948).

²⁾ C. *Gernez-Rieux & A. Tacquet*, Adv. Tuberc. Res. **5**, 66, S. Karger, Basel/New York 1952.

³⁾ Y. *Takeda, Y. Aoki, N. Wakita, T. Watanabe & N. Kasai*, Jap. J. Tuberc. **2**, 216 (1954); s. a. *ibid.* **2**, 307 (1954).

⁴⁾ G. *Middlebrook*, Ann. Rev. Med. **5**, 339 (1954).

⁵⁾ E. *Sorkin & S. V. Boyden*, J. Immunol. **75**, 22 (1955).

⁶⁾ S. V. *Boyden & W. E. Suter*, J. Immunol. **68**, 577 (1952).

⁷⁾ G. *Middlebrook*, Bull. N. Y. Acad. Med. **28**, 474 (1952).

⁸⁾ J. *Bretey & A. Lamensans*, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. **232**, 1880 (1951); A. *Lamensans, P. Grabar & J. Bretey*, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. **232**, 1967 (1951).

Nukleinsäure-Gemisch in Lösung ging. Der mit „St.“ bezeichnete Rückstand besass eine starke sensibilisierende Wirkung für rote Blutkörperchen und enthielt 0,42% Stickstoff. Elektrophoretische Untersuchungen mit „St.“ deuteten auf Homogenität hin, aber weitere Einzelheiten oder chemische Untersuchungen sind unseres Wissens nicht veröffentlicht worden.

Wir berichteten kürzlich⁵⁾, dass nicht erhitzte Fraktionen aus Kulturfiltraten von *M. tuberculosis* zumindest zwei Substanzen mit verschiedener serologischer Spezifität enthalten, die beide im *Middlebrook-Dubos-Test* sensibilisierende Wirkung für rote Blutkörperchen aufweisen. Diese Antigene wurden als α - und β -Hämosensitine bezeichnet. Durch Kreuzreaktionen mit aktiven Präparaten aus erhitzten und aus nicht erhitzten Kulturen konnte die Gegenwart von α -Hämosensitin sowohl in den erhitzten als auch in den nicht erhitzten Fraktionen nachgewiesen werden. Die Thermostabilität der Molekel oder jedenfalls der für die Spezifität und Fixation an Erythrozyten verantwortlichen Teile war somit erwiesen.

β -Hämosensitin ist dagegen thermolabil und konnte nur in nicht erhitzten Fraktionen nachgewiesen werden. Einstündiges Erhitzen im Autoklaven auf 110° setzte die sensibilisierende Aktivität des Hämosensitins fast auf Null herab. Untersuchungen über seine Isolierung, chemische Struktur und Bedeutung im Infektionsgeschehen sind zur Zeit im Gange.

In der vorliegenden Abhandlung berichten wir über die Isolierung, den chemischen Aufbau und die serologischen Eigenschaften gereinigter α -Hämosensitinpräparate. Die bisherigen Versuchsergebnisse deuten die Struktur eines Lipopolysaccharid-Protein- (oder Peptid)-Komplexes für das α -Hämosensitin an.

Experimenteller Teil.

Methodik und Materialien.

Die Protein-Bestimmungen wurden mit dem Biuretreaagens ausgeführt und die Lösungen bei 540 μ in einem *Beckman-Spektrophotometer* (Modell DU) gemessen.

Zur Polysaccharidanalyse der Fraktionen wurde zuerst das *Dreywood's Anthron-Reagens* nach *Morris*⁹⁾ benutzt. Es wurden befriedigende Ergebnisse mit einer dem *Seibert'schen Polysaccharid II*¹⁰⁾ entsprechenden Fraktion, die hauptsächlich aus Glucoseeinheiten besteht, erzielt. Dagegen ergab die Anthronmethode bei den in dieser Mitteilung beschriebenen Polysaccharidfraktionen, die bis zu 50–60% Arabinose und ausserdem Mannose, Galaktose und Hexosamin enthielten, nur ein unvollständiges Ergebnis, wenn Glucose als Standardsubstanz verwandt wurde. Die für das Polysaccharid gefundenen Prozentziffern waren viel zu niedrig. Die Pentose Arabinose gibt nämlich mit dem Anthronreagens eine Farbe, die schnell ausblasst und einen Mindestwert erreicht, während die Farbe für Hexose ihr Maximum erreicht. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von *Yemm & Willis*¹¹⁾ mitgeteilt.

⁹⁾ *D. L. Morris*, *Science* **107**, 254 (1948).

¹⁰⁾ *F. B. Seibert*, *Amer. Rev. Tuberc.* **59**, 86 (1949); *F. B. Seibert*, *M. Stacey & P. W. Kent*, *Biochem. Biophys. Acta* **3**, 632 (1949).

¹¹⁾ *E. W. Yemm & A. J. Willis*, *Biochem. J.* **57**, 508 (1954).

Der Pentosegehalt unserer hier beschriebenen Polysaccharidfraktionen wurde dann nach *Dische*¹²⁾ mittels der Cystein-Schwefelsäure-Reaktion bestimmt. Als Standardsubstanz diente Arabinose, da dieser Zucker nach papierchromatographischen Befunden (siehe unten) die einzige vorkommende Pentose war. Die Standardkurve für Arabinose folgt dem *Beer*'schen Gesetz, die Neigung der Kurve ist aber von der angewandten Schwefelsäure (*Merck purissimum*), der Glassorte und der Mischungsmethode abhängig.

10 mg-proz. Lösungen wurden sowohl für Pentose- als auch Hexosebestimmungen angewendet. Arabinose ergibt mit dem Anthronreagens einen konstanten Wert von $E_{0,125} = 0,126$. Enthält die untersuchte Lösung, bestimmt mit der Cystein-Methode, A % Pentose und bezeichnet B die Extinktion in der mit Glucose als Standardsubstanz ausgeführten Anthron-Bestimmung, so wird die Korrektur für die Gegenwart von Pentose in der Hexosebestimmung wie folgt vorgenommen.

A Prozent Pentose $\times 0,125 = C =$ Wert, der vom Extinktionswert der Anthronbestimmung subtrahiert werden muss.

B (Extinktion mit Anthron) $- C =$ wirkliche Extinktion; dieser Wert ist für das Ablesen des Hexoseprozents von der Standardkurve zu verwenden.

Die Schlusswerte sind immer noch zu niedrig, da als Standard Glucose verwandt wurde anstatt des im Polysaccharid vorliegenden Mannose-Galaktose-Gemisches unbekanntem Verhältnisses.

Die oben beschriebene Methode ist noch nicht ganz befriedigend, hauptsächlich infolge der Schwankungen in den Pentosebestimmungen (bis zu 7%). Die Methode ergibt jedoch zuverlässige Anhaltspunkte für die Zusammensetzung von Pentose und Hexose enthaltenden Polysacchariden.

Der Gehalt an Desoxyribonucleinsäure wurde mit *Dische*'s Diphenylaminreagens bestimmt¹³⁾.

Papierelektrophorese. Die von uns verwandte Methode ist bereits ausführlich beschrieben worden (*Sorkin & Rhodes*¹⁴⁾). Es wurde Veronalpuffer pH = 8,6, μ 0,1 verwendet.

Die auf dem Papier aufgetragenen Kohlenhydrate wurden nach der Elektrophorese mit Perjodsäure oxydiert und nach Auswaschen der überschüssigen Säure mit Fuchsin-schwefeliger Säure angefärbt (*Köiw & Grönwall*¹⁵⁾). Die Polysaccharide liessen sich auch mit Wasser direkt vom Papier eluieren und mittels der Anthronmethode nach *Morris* bestimmen. Protein wurde auf dem Papier durch Anfärbung mit Bromphenolblaulösung nach *Durram*¹⁶⁾ sichtbar gemacht.

Freie Elektrophorese. Die von *Tiselius* beschriebene Apparatur für freie Elektrophorese wurde benützt. Phosphatpuffer pH = 7,65, μ 0,2. Die Versuche wurden in verdankenswerter Weise unter Leitung von Ing. A. *Birch-Andersen* ausgeführt.

Papierchromatographie des hydrolysierten Polysaccharides. Die neutralisierten Hydrolysate wurden 46 Std. mit Collidin-Wasser als Lösungsmittel oder 24 Std. mit Phenol-Wasser-Gemisch aufsteigend chromatographiert. Zur Sichtbarmachung der Zucker kamen Silbernitrat-Ammoniak- oder Anilinphtalat-Lösungen nach *Partridge*¹⁷⁾ zur Anwendung.

Der Gehalt an reduzierendem Zucker wurde nach der *Hagedorn-Jensen*-Methode bestimmt¹³⁾. Hierzu wurden 5 ml einer 0,1-proz. Lösung der Präparate 6 Std. mit 5-n. Salzsäure hydrolysiert.

¹²⁾ *Z. Dische*, J. biol. Chemistry **181**, 379 (1949); *Z. Dische*, in Methods of Biochemical Analysis, Bd. II, S. 313, D. Glick, Editor, Interscience Publishers, New York 1955.

¹³⁾ Siehe *E. A. Kabat & M. M. Mayer*, Experimental Immunochemistry, S. 318, C. C. Thomas, Springfield, Ill. 1948.

¹⁴⁾ *E. Sorkin & J. M. Rhodes*, Helv. **39**, 1538 (1956).

¹⁵⁾ *E. Köiw & A. Grönwall*, Scand. J. clin. Lab. Invest. **4**, 245 (1952).

¹⁶⁾ *E. L. Durram*, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2943 (1950).

¹⁷⁾ *S. M. Partridge*, Biochem. J. **42**, 238, 251 (1948); Nature **164**, 443 (1949).

Herstellung der Tuberkelbazillenkulturen. *Stamm*: Virulenter Humanstamm E 9656 (Kopenhagen).

Nährboden: Modifiziertes *Sauton*-Medium mit Zusatz von Glucose¹⁸⁾.

Inkubation: 28–30 Tage bei 37°.

Einsammlung der Kulturfiltrate: Wie früher beschrieben¹⁸⁾.

Serologische Prüfung: Für die Austestung der Präparate im *Middlebrook-Dubos*-Test siehe auch die Angaben von *Sorkin & Boyden*⁵⁾. Zur Anwendung kam Serum von Kaninchen, die mit durch Phenol getöteten Tuberkelbazillen (H₃₇Rv) immunisiert wurden.

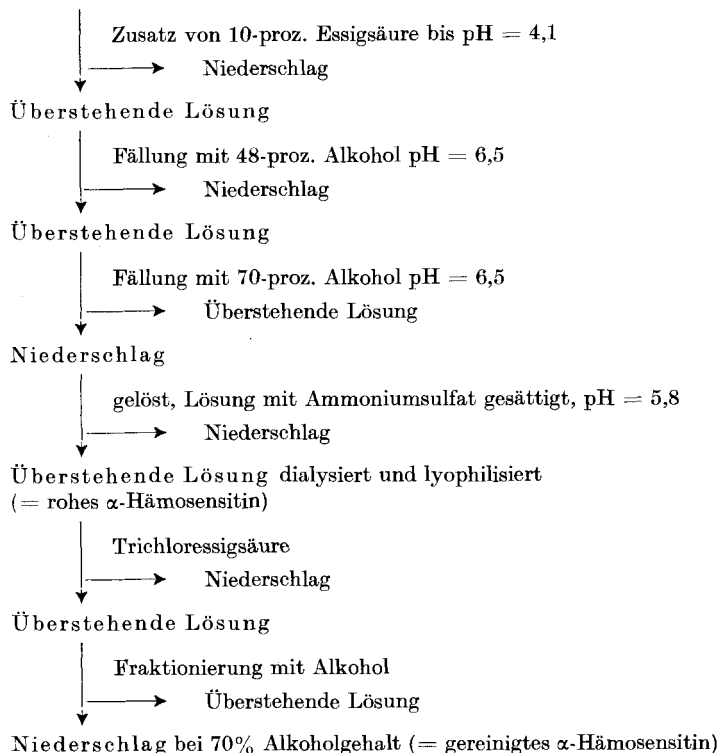
Als „sensibilisierende Aktivität“ oder α -Hämosensitin-Aktivität bezeichnen wir die Wirkung der Präparate, Schaferythrozyten zur spezifischen Hämagglutination durch Kaninchen-anti-H₃₇Rv-Serum zu sensibilisieren.

Als „hemmende Aktivität“ eines Präparates bezeichnen wir seine Fähigkeit, die durch Antikörper bedingte hämagglutinierende Wirkung auf rote Blutkörperchen, die mit α -Hämosensitin sensibilisiert sind, zu neutralisieren.

Resultate.

Isolierung von gereinigtem α -Hämosensitin:

Konzentriertes Kulturfiltrat von humanen virulenten Tuberkelbazillen



Sowohl die erhitzten als auch die nicht erhitzten Kulturen von *M. tuberculosis* wurden nach dem hier beschriebenen Verfahren aufgearbeitet.

¹⁸⁾ S. V. Boyden & E. Sorkin, *J. Immunol.* **75**, 15 (1955).

40 l Seitz-filtriertes Kulturfiltrat wurden durch Ultrafiltration auf 200 ml konzentriert. Die Fraktionierung des braunen Konzentrates erfolgte ähnlich den früher veröffentlichten Angaben¹⁴⁾¹⁸⁾ durch sukzessive Behandlung mit 10-proz. Essigsäure bei pH = 4,1, 48-proz. Alkohol bei pH = 6,5 und 70-proz. Alkohol bei pH = 6,5. Der mit 70-proz. Alkohol erhaltene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in 40 ml Wasser gelöst und daraus durch Sättigung mit Ammoniumsulfat bei pH = 5,8 die Hauptproteinverunreinigung ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit gesättigtem Ammoniumsulfat gewaschen. Der Niederschlag enthielt immer noch eine gewisse Menge aktives Material und wurde deshalb noch zweimal durch Sättigung mit Ammoniumsulfat umgefällt. Die vereinigten, nach der Ammoniumsulfat-Behandlung erhaltenen überstehenden Lösungen enthielten die Hauptmenge der α -Hämosensitin-Aktivität. Die wässrige Lösung wurde unter Umrühren gegen oftmals ausgetauschtes dest. Wasser dialysiert, durch Ultrafiltration konzentriert und zuletzt lyophilisiert. Die Ausbeute aus 40 l Kulturfiltrat schwankte zwischen ca. 800 und 1200 mg für erhitzte Kulturen und zwischen 400 und 1000 mg für nicht erhitzte Kulturen.

Im chemischen Sinn waren die Präparate in diesem Stadium nicht homogen, wie aus den Analysen hervorgeht.

Tabelle I.

Rohes α -Hämosensitin aus erhitzten Kulturfiltraten		Rohes α -Hämosensitin aus nicht erhitzten Kulturfiltraten	
Protein:	26%		13,4%
Hexose:	12,5%		25%
Pentose:	45%		54%
Desoxyribonucleinsäure:	15%		2,4%
Glykogen:	Spuren		Spuren

Serologische Aktivität. Die Produkte besaßen auf dieser Stufe des Reinigungsprozesses eine starke Hämosensitin-Aktivität (0,007 mg/ml), die sich durch die nachfolgende Reinigung noch weiter erhöhen liess.

Weitere Reinigung des Hämosensitin-Präparates. 0,45 g Rohhämosensitin wurden in 25 ml Wasser gelöst, mit 10-proz. Trichloressigsäure auf pH = 3,5 gebracht und 15 Min. bei 14000 Umdreh./Min. zentrifugiert („Pirouette“ Zentrifuge, PHYWE, Göttingen). Der Rückstand wurde nochmals umgefällt. Die vereinigten überstehenden Lösungen wurden durch portionsweise Zugabe von abs. Alkohol bis zu 25%, 50%, 70% und 90% Alkoholgehalt fraktioniert. Die Niederschläge wurden abzentrifugiert und mit Alkohol gleicher Konzentration gewaschen. Nach Lösen in Wasser wurde mit Alkohol umgefällt, die Niederschläge gelöst, dialysiert und lyophilisiert.

Tabelle II gibt die Ergebnisse einer solchen Fraktionierung einer grösseren Menge vereinigter, nicht erhitzter Präparate wieder.

Tabelle II.

Alkoholfractionierung von 1,86 g α -Hämosensitin enthaltendem, stark aktivem Rohmaterial aus nicht erhitzten Kulturen, nach Trichloressigsäurebehandlung.

Fraktion gefällt durch	Protein %	Polysaccharid		Desoxy- ribonucleinsäure %	Ausbeute mg
		Hexose %	Pentose %		
25% Alkohol	72,0	5	13	1,0	57
50% Alkohol	33,1	20	45	1,0	103
70% Alkohol	4,0	25	61	0,2	360
90% Alkohol	26,4	15,5	39	—	68

Die drei ersten Fraktionen sensibilisierten rote Blutkörperchen im *Middlebrook-Dubos*-Test in Verdünnungen von 0,001—0,002 mg/ml. Die mit 90% Alkohol ausgefällte Fraktion war inaktiv selbst bei 2 mg/ml. Der wechselnde, relativ hohe Gehalt an Protein in den mit 25% bzw. 50% Alkohol gefällten Fraktionen liess auf eine Proteinverunreinigung schliessen. Die Frage, ob die restlichen 4% Protein (oder Polypeptid) der 70%-Alkohol-Fraktion ebenfalls als Verunreinigung angesehen werden müssen, wird weiter unten diskutiert.

Präparate aus erhitzten Kulturen zeigen ähnliches Verhalten, doch ist ihr Gehalt an denaturierten Nucleinsäuren oft höher. Durch Behandeln mit Formamid kann Nucleinsäure weggelöst werden, und man gelangt dann zu Präparaten gleicher oder ähnlicher Zusammensetzung, wie in Tabelle I und II angegeben.

Für die weiteren Untersuchungen wurde die mit 70% Alkohol ausfällbare Fraktion gewählt, die die stärkste biologische Wirkung aufwies und die wir im folgenden als gereinigtes α -Hämosensitin-Präparat bezeichnen werden.

Eigenschaften gereinigter α -Hämosensitin-Präparate: Weisses hygroskopisches Pulver, das sich in Wasser leicht und klar löst. Die bisher reinsten α -Hämosensitin-Präparate sensibilisieren Schaf-Erythrozyten, so dass diese noch bei einer Verdünnung von 0,001 mg/ml durch Kaninchen-anti-H₃₇Rv-Sera agglutiniert werden. Die analytischen Ergebnisse und Eigenschaften sind in Tabelle III zusammengefasst.

Tabelle III.Analytische Daten und Eigenschaften gereinigter α -Hämosensitin-Präparate.

Sensibilisiert rote Blutkörperchen ⁵⁾	0,001 mg/ml
Wasser	4%
Asche	0,9%
Phosphor	0
Stickstoff	0,5%
Acetyl	0
Protein	4%
Desoxyribonucleinsäure	0,2%
Pentose	61%
Hexose	25%
Hexosamin	1,3%
Durch Chromatographie ermittelte Zucker	Arabinose, Galaktose, Mannose, Glucosamin? (Inositol?)
Fettsäuren nach alkalischer Verseifung. .	1%
Reduktionsvermögen nach Hydrolyse, in Glucose ausgedrückt	83%
$[\alpha]_D^{20}$ in Wasser	+ 72°; nach saurer Hydrolyse – 10° nach alkal. Hydrolyse + 68°
Papierelektrophoretische Homogenität . .	zweifelhaft
Verhalten bei freier Elektrophorese . . .	nicht homogen
Erythrozyten sensibilisierende Akti- vität) bei Alkali-Behandlung	inaktiviert
Hemmende Aktivität (serolog. Spezi- fität bei Alkali-Behandlung.	stabil
Säure-Behandlung	inaktiviert
Trypsin-Behandlung	ohne Wirkung
Pepsin-Behandlung	ohne Wirkung
Lipase-Behandlung	ohne Wirkung

Es geht daraus hervor, dass das gereinigte Material hauptsächlich aus Hexose und Pentose enthaltendem Polysaccharid besteht. Der sehr hohe Pentosegehalt — 61% — ist, wie aus den Ergebnissen der Papierchromatographie hervorgeht, durch Arabinose bedingt. Der Gesamtanteil an Polysaccharid entspricht etwa 87%, sofern Arabinose als Standard für die Pentose und Glucose als Standard für die Hexose-Bestimmungen gebraucht wird. Die letzteren Bestimmungen ergeben aber zu niedrige Werte, da Galaktose und Mannose in unseren Präparaten vorliegen.

Der *Stickstoffgehalt* (0,5%) der Präparate ist teils der Biuret-positiven Komponente (4%) und teils dem Hexosamin (1,3%) zuzuschreiben.

Hexosamin: Der Gehalt an Hexosamin war 1,3%, wobei wir noch nicht wissen, ob es sich um Galaktosamin oder Glucosamin handelt. Die Rf-Werte beider Kohlehydrate in der Papierchromatographie sind sehr ähnlich.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +72^{\circ}$ (Wasser, $c = 0,208$); bei saurer Hydrolyse (5-proz. H_2SO_4) sinkt die optische Drehung und erreicht nach dreistündigem Erhitzen im siedenden Wasserbad den konstanten, negativen Wert $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ}$.

Alkalische Hydrolyse von gereinigtem α -Hämosensitinpräparat. 100 mg wurden mit 25 ml 0,05-n. Natronlauge unter Rückfluss auf dem siedendem Wasserbad erhitzt. Nach 3 Std. wurde die noch immer wasserklare Lösung abgekühlt und mit 0,5-n. Salzsäure neutralisiert. Es entstand keine Trübung oder Fällung. Nach mehrmaliger Extraktion mit Äther, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen verblieb an Ätherlöslichem ein sehr geringer wachsähnlicher Rückstand.

Die wasserlösliche Fraktion wurde neutralisiert, dialysiert und lyophilisiert: 71 mg weisses Pulver, $[\alpha]_D^{20} = +68^{\circ}$ (Wasser).

Das Ätherlösliche wurde in Benzol gelöst, filtriert, eingedampft, nochmals in Äther gelöst und mit Methanol gefällt. Ausbeute 1,0 mg wachsartiges Produkt, das zwischen 42° und 58° schmolz; in Äther, Chloroform und Benzol löslich, dagegen unlöslich in Wasser, Äthanol, Methanol und Aceton.

*Hydroxamat-Probe des Ätherlöslichen auf Carbonsäure*¹⁹): positiv.

Ziehl-Neelsen-Probe des Ätherlöslichen auf Säurefestigkeit: positiv.

Wiederholung der Hydrolyseversuche mit anderen im *Middlebrook-Dubos-Test* aktiven, sensibilisierenden Präparaten ergab in jedem Falle analoge Fraktionen und Reaktionen, was auf die Anwesenheit von Fettsäure(n) (Mykolsäuren?) in den α -Hämosensitin-Fraktionen schliessen lässt.

Titration des Ätherextraktes mit 0,01-n. Kalilauge in Methanol mit Phenolphthalein als Indikator ergab ein Äqu.-Gew. 900 (Kontrollwert für α -Mykolsäure: 1260).

Papierchromatographische Untersuchung von sauren Hydrolysaten von α -Hämosensitinpräparaten. 20 mg Antigen wurden mit 10 ml 5-proz. Schwefelsäure 3 Std. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Neutralisieren mit frischgefälltem Bariumcarbonat und Eindampfen des Filtrates bei 40° im Vakuum wurde der Rückstand in Wasser gelöst, durch Papier filtriert und nochmals eingeeengt. 30 μ l Hydrolysat wurden auf *Whatman*-Papier Nr. 1 aufgetragen.

Zahlreiche ein- und zweidimensionale Chromatogramme liessen die Gegenwart von folgenden Monosacchariden erkennen: Arabinose, Galaktose, Mannose, Hexosamin und ein noch nicht identifizierter Flecken von geringer Mobilität (Rf: in Collidin 0,071; in Phenol 0,081). Dieser Flecken liess sich nicht mit Anilinphtalat, aber wohl durch Besprühen mit $AgNO_3$ -Ammoniaklösungen nachweisen. Es lässt sich deshalb die Gegenwart von Inositol nicht ausschliessen.

Homogenität der gereinigten hochaktiven α -Hämosensitinpräparate.
a) *Papierelektrophoretische Untersuchungen*. Papierelektrophorese mit Veronalpuffer $pH = 8,6$ und $\mu = 0,1$ liess eine gewisse Inhomogenität der Präparate erkennen. Das „Poly-

¹⁹) *F. Feigl*, Qualitative analysis by spot tests, S. 355, Elsevier Publ. Comp., New York 1946.

saccharid“ entfernte sich nur 4–5 cm vom Ausgangspunkt gegen die Anode hin, zeigte aber deutlich 2 Zonen. Eine schneller wandernde Proteinkomponente konnte nicht nachgewiesen werden.

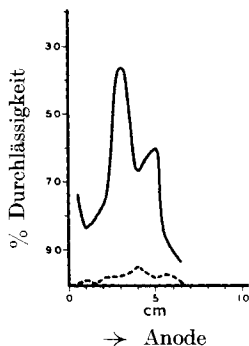


Fig. 1.

Papierelektrophoretische Analyse von gereinigtem α -Hämosenitin-Präparat in Veronalpuffer pH = 8,6, μ 0,1, 200 V, 12,5 mAmp., 24 Std., 4°, 20 μ l einer 20-proz. Lösung des Präparates wurden aufgetropft.

- Polysaccharid-Werte nach Elution der Papierstreifen; Reaktion mit Anthron und Auswertung bei 625 $m\mu$.
- - - Protein-Werte nach Anfärben eines Parallelstreifens mit Bromphenolblau, Elution der Segmente und Auswertung bei 595 $m\mu$.

Wie Fig. 1 zeigt, konnte dagegen durch Anfärben eines Parallelstreifens mit Bromphenolblau ein schwacher Proteinfleck sichtbar gemacht werden, dessen Entfernung vom Startpunkt mit derjenigen der Polysaccharidzonen übereinstimmte. Es darf demnach eine enge Verknüpfung von Polysaccharid und Protein vermutet werden. Werden die Streifen mit Fuchsin bzw. mit Bromphenolblau angefärbt, so ergibt sich das Bild der Fig. 2.

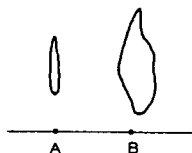


Fig. 2.

Papierelektrophoretische Analyse von gereinigtem α -Hämosenitin-Präparat.
Bedingungen wie unter Fig. 1.

- A = Proteinanfärbung mit Bromphenolblau.
- B = Polysaccharidanfärbung mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion.

Es ist deutlich, dass die Fuchsinanfärbung die Inhomogenität des Präparates nicht sichtbar zu machen vermag.

b) *Freie Elektrophorese*. Wiederholte Versuche mit zahlreichen Präparaten von gereinigtem α -Hämosenitin aus erhitzten Kulturen in Phosphatpuffer pH = 7,65 und μ 0,2 zeigten eine deutliche Inhomogenität. Diese war nicht sehr ausgeprägt in den Präparaten aus nicht erhitzten Kulturen (Fig. 3).

In den Präparaten aus durch Hitze getöteten Kulturen wurden neben der Hauptkomponente zumeist 2 weitere Komponenten in der aufsteigenden Seite gefunden. Wie Fig. 4 zeigt, entsprachen aber überraschenderweise die elektrophoretischen Diagramme auf der absteigenden Seite nicht denen auf der aufsteigenden Seite.

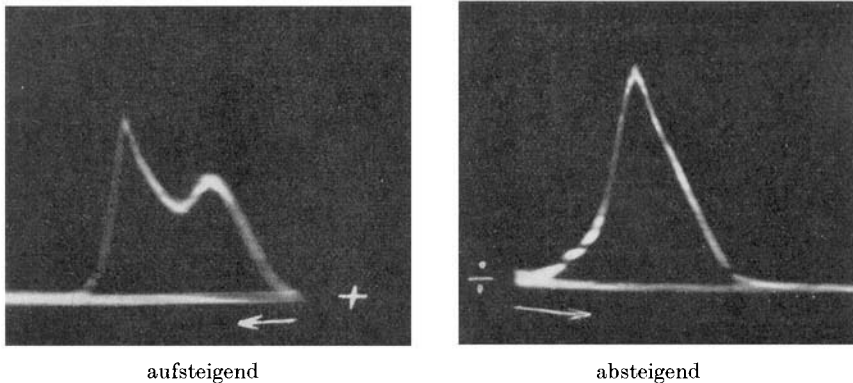


Fig. 3.

Elektrophoresediagramme von gereinigtem α -Hämosensitin-Präparat aus nicht erhitzten Kulturen von *M. tuberculosis*.
Phosphatpuffer pH = 7,65, μ 0,2.

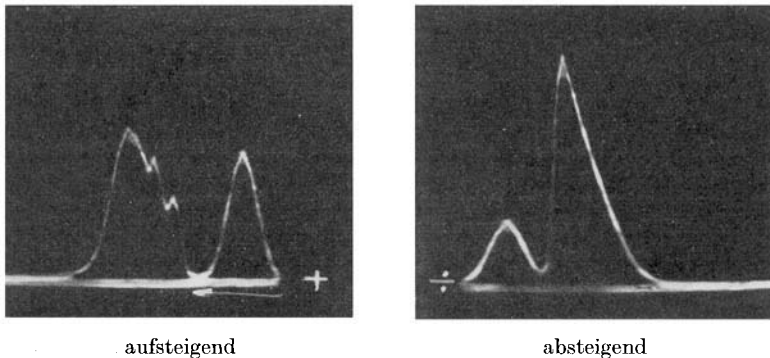


Fig. 4.

Elektrophoresediagramme von gereinigtem α -Hämosensitin-Präparat aus hitzegetöteten Kulturen von *M. tuberculosis*.
Phosphatpuffer pH = 7,65, μ 0,2.

Der Grund für diese Diskrepanz ist uns noch unbekannt.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Spitzen sind von gleicher Grössenordnung wie die von γ -Globulin.

Da die analytisch-chemischen Ergebnisse grössere Mengen von Protein, Desoxyribonucleinsäure oder Fettsäure als Verunreinigung von α -Hämosensitin ausschliessen, kann vermutet werden, dass unsere Präparate aus strukturell und eventuell serologisch eng verwandten Polysacchariden zusammengesetzt sind, deren Trennung durch das geschilderte Fraktionierungsverfahren nicht ganz gelungen war. Im Gang befindliche Untersuchungen scheinen diese Arbeitshypothese zu stützen.

c) *Serologische Prüfung auf Homogenität.* 0,001 mg/ml der gereinigten α -Hämosensitin-Präparate sensibilisierten rote Blutkörperchen unter den früher beschriebenen Bedingungen⁵⁾ zur spezifischen Hämagglutination durch Kaninchen-anti-tb-Serum im *Middlebrook-Dubos-Test*. Der Tannin-Hämagglutinations-Test²⁰⁾ zum Nachweis von Pro-

²⁰⁾ S. V. Boyden, J. exp. Med. **93**, 107 (1951).

teinantigenen²¹⁾ fiel negativ aus. Durch die Kreuzhemmungstechnik im *Middlebrook-Dubos-Test* (*Sorkin & Boyden*⁵⁾) konnte die Anwesenheit von β -Hämosensitin ausgeschlossen werden.

Wirkung der gereinigten α -Hämosensitin-Präparate im Hauttest. Die Wirkung in der Hautreaktion wurde am BCG-Meerschweinchen mit PPD-S, dem internationalen Standard, verglichen. 0,5 mg/ml des α -Hämosensitin-Präparates gaben nach 24 Std. eine Reaktion, die der von 0,01 mg/ml PPD-S vergleichbar war. Nach 48 Std. dagegen zeigten 0,5 mg/ml gereinigtes α -Hämosensitin, das ist eine 50mal stärkere Dosis als die schwächste noch wirksame PPD-S-Injektion, keine Tuberkulinreaktion.

Wirkung von Hitze auf die gereinigten α -Hämosensitin-Präparate. Erhitze man α -Hämosensitin-Präparate 3 Std. in neutraler, wässriger Lösung auf 100°, so zeigten sie im *Middlebrook-Dubos-Test* (Hemmungstechnik) keinen Aktivitätsverlust. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass sich α -Hämosensitin-Aktivität aus Kulturen isolieren lässt, die 1 Std. im Autoklaven auf 110° erhitzt wurden.

Wirkung von Enzymen auf die Aktivität im *Middlebrook-Dubos-Test*. Weder Pepsin, Trypsin noch Lipase haben bei optimalem pH irgendeinen Einfluss auf die sensibilisierende oder die hemmende Wirkung des α -Hämosensitins. Das Unvermögen der proteolytischen Enzyme, die serologischen Charakteristika zu verändern, ist von Interesse, da das Präparat etwa 4% Protein enthält.

Trypsinbehandlung von Fraktionen, wie etwa PPD, zerstört dagegen vollständig die serologische Aktivität im Tannin-Hämagglutinationstest, einer Methode, die Protein-Antigene misst.

Die Wirkung alkalischer und saurer Hydrolyse auf die serologische Aktivität im *Middlebrook-Dubos-Test*. Je 10 mg Substanz wurde mit 5 ml 0,05-n. Natronlauge bzw. 0,01-n. Salzsäure auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden 0,5 ml Proben abpipettiert, mit 0,1-n. Salzsäure bzw. 0,1-n. Natronlauge neutralisiert, mit genügend kristallisiertem Natriumchlorid versetzt, um eine 0,95-proz. NaCl-Lösung zu erhalten, und auf sensibilisierende und hemmende Aktivität geprüft (s. Tab. IV). Endkonzentration des „Antigens“ = 1 mg/ml.

Tabelle IV.

Wirkung von alkalischer und saurer Hydrolyse auf die serologische Aktivität von gereinigtem α -Hämosensitin.

Dauer der Hydrolyse	Sensibilisierende Wirkung Grenzkonz. mg/ml		Hemmende Wirkung max. Verdünnung	
	alkalisch	sauer	alkalisch	sauer
— = Kontrolle	0,0005	0,001	1/16000	1/65536
5 Min.	0,008	0,13	1/16000	1/16000
10 Min.	—	—	—	1/256
15 Min.	0,5	—	1/16000	1/1
30 Min.	>1	>1	1/16000	<1/1
1 Std.	>1	>1	1/16000	<1/1
2 Std.	>1	>1	1/16000	<1/1
4 Std.	>1	>1	1/16000	<1/1
6 Std.	>1	>1	1/16000	<1/1
8 Std.	—	>1	—	<1/1

Die sensibilisierende Wirkung sinkt sowohl bei saurer als auch alkalischer Hydrolyse recht schnell auf Null ab, was auf eine wichtige Änderung in der Molekel deutet. Die hemmende Wirkung dagegen wird nur durch saure Hydrolyse zerstört und bleibt bei alkalischer

²¹⁾ *S. V. Boyden & E. Sorkin, J. Immunol. 75, 15 (1955).*

Hydrolyse erhalten. Eine Reihe von Faktoren wie Spaltung einer Fettsäureesterbindung, Hydrolyse von Polysaccharid oder weitere Denaturierung des Proteins bzw. Peptidanteils können als mögliche Ursachen des Verlustes an sensibilisierender Wirkung in Betracht gezogen werden.

Fig. 5 veranschaulicht graphisch die Wirkung der sauren und der alkalischen Hydrolyse auf die hemmende Aktivität im *Middlebrook-Dubos*-Test.

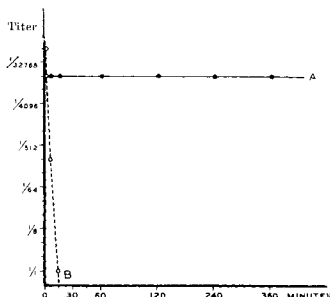


Fig. 5.

Die Wirkung von alkalischer und saurer Hydrolyse auf die hemmende Aktivität von α -Hämosensitin-Präparaten im *Middlebrook-Dubos*-Test.

A = nach alkalischer Hydrolyse.

B = nach saurer Hydrolyse.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass saure Hydrolyse die antigene Struktur des α -Hämosensitins zerstört, und wir nehmen an, dass der für die Spezifität verantwortliche Polysaccharidanteil unter Glycosidspaltung in einfache Kohlehydratkomponenten zerlegt wird.

Diskussion.

Seit der Beobachtung von *Keogh, North & Warburton*²²), dass bakterielle Polysaccharide sich an Erythrozyten anlagern können und dass als Folge solcher Anlagerungen die Erythrozyten die Fähigkeit erhalten, durch Reaktion mit spezifischen, gegen diese Polysaccharide gerichteten Antikörpern die roten Zellen zu agglutinieren, ist ein Test auf dem Gebiet der Tuberkulose von *Middlebrook & Dubos*¹) ausgearbeitet worden.

Die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse, die bei den klinischen Untersuchungen von verschiedenen Bearbeitern erzielt wurden, veranlasste uns zu Untersuchungen von Präparaten, die hochaktiv sind in ihrer sensibilisierenden Wirkung auf rote Blutzellen im *Middlebrook-Dubos*-Test. Die Homogenität der Präparate wurde analytisch-chemisch, durch Papierelektrophorese, freie Elektrophorese und serologisch überprüft. Eine grössere Uneinheitlichkeit liess sich mit Sicherheit nur in der Elektrophorese im *Tiselius*-Apparat bei aus erhitzten Kulturfiltraten isolierten Präparaten nachweisen.

Die Ergebnisse der chemischen Untersuchung unserer Präparate deuten in Übereinstimmung mit den Befunden früherer Autoren

²²) *E. V. Keogh, E. A. North & M. F. Warburton, Nature* **161**, 687 (1948).

darauf hin, dass eine der Erythrozyten-sensibilisierenden Substanzen (α -Hämosensitin) vermutlich Kohlenhydratcharakter besitzt. Darüber hinaus weisen unsere Versuche darauf hin, dass das Polysaccharid mit einer (oder mehreren) Fettsäuremolekel(n) (Mykolsäure?) verknüpft ist.

Es ist von Interesse, dass die α -Hämosensitinpräparate nicht ganz von einer biuretpositiven Komponente befreit werden konnten. Die Tatsache, dass uns eine Trennung von Polysaccharid und Protein (oder Peptid) weder mittels Papierchromatographie (unveröffentlicht) noch durch Papierelektrophorese gelang, lässt eine starke Affinität der eventuellen Proteinverunreinigung zum Polysaccharid oder eine feste chemische Bindung zwischen den beiden Komponenten vermuten. Ähnliche Beobachtungen haben *Seibert & Watson*²³⁾ bei einem verwandten Polysaccharid, und *Asselineau* und Mitarb.²⁴⁾ bei einem aus virulenten Tuberkelbazillen gewonnenen Lipopolysaccharid-peptid-Komplex gemacht.

Im gleichen Sinne spricht die Tatsache, dass eine Reihe von eiweissfällenden Reagentien wie heisse und kalte Pikrinsäure, Tannin, Trichloressigsäure und Salzsäure mit dem gereinigten α -Hämosensitin keinerlei Trübung oder Abspaltung von Protein ergaben. Behandlung mit Trypsin, Pepsin oder Chloroform-Alkohol veränderte den Proteingehalt nicht.

Eine Untersuchung der Zuckerkomponenten des gereinigten α -Hämosensitins nach saurer Hydrolyse ergab einen hohen Gehalt an Pentose (Arabinose). Ausserdem konnten Galaktose, Mannose, Hexosamin und eine nicht sicher identifizierte reduzierende Komponente (vermutlich Inositol) nachgewiesen werden. Der hohe Pentosegehalt unseres Produktes wurde während der Reinigung des α -Hämosensitins als Leitkriterium verwendet, da nie ein aktives Präparat ohne Pentose beobachtet wurde.

Als sehr aufschlussreich erwiesen sich die Hydrolyseversuche an gereinigten α -Hämosensitin-Präparaten mit Säure und Alkali. Während schon durch kurzfristige Säurehydrolyse sowohl die sensibilisierende wie die hemmende Wirkung verloren gehen, wird durch Alkali nur die sensibilisierende Wirkung zerstört. *Iland & Peacock*²⁵⁾ haben kürzlich ähnliche Angaben gemacht. Wir möchten unsere Befunde, die durch das Isolieren von Fettsäuren aus alkalisch behandelten Hämosensitin-Präparaten gestützt werden, dahin interpretieren, dass die sensibilisierende Fraktion einen Lipopolysaccharid-Komplex enthält, in dem der Polysaccharidanteil den Träger der Spezifität darstellt.

²³⁾ *F. B. Seibert & D. W. Watson*, *J. biol. Chemistry* **140**, 55 (1941).

²⁴⁾ *J. Asselineau, N. Choucrroun & E. Lederer*, *Biochim. biophys. Acta* **5**, 197 (1950).

²⁵⁾ *C. N. Iland & D. B. Peacock* in *Ciba Symposium on Experimental Tuberculosis*, S. 163, J. and A. Churchill, London 1955.

In diesem Zusammenhang sind die von *Boyden & Grabar*²⁶⁾ kürzlich veröffentlichten Untersuchungen über die Art der Bindung des α -Hämosensitins an die Erythrozyten von Interesse. Diese Autoren vermuten, dass der hier postulierte Lipoidanteil des Hämosensitins von Lipoid-Rezeptoren der Erythrozyten wie z. B. Lecithin oder Kephalin gebunden wird. Welche Bedeutung eine derartige Fixierung des bakteriellen Produktes an rote oder weisse Blutkörperchen (*Boyden*²⁷⁾) für den Verlauf der Tuberkuloseinfektion hat, ist allerdings unbekannt.

Ein Pentose enthaltendes Polysaccharid ist von zahlreichen Untersuchern aus Tuberkelbazillen isoliert worden. Einige von ihnen haben uns freundlicherweise ihre Präparate zur Verfügung gestellt. Bei einem Präparat, MB 200, von *Masucci* und Mitarb.²⁸⁾, wurde schon früher auf serologischem Weg festgestellt (*Heidelberger & Menzel*²⁹⁾), dass es zumindest 3 verschiedene Polysaccharide enthielt. Es war im *Middlebrook-Dubos*-Test weder sensibilisierend noch hemmend wirksam.

Die Polysaccharide I und II von *Seibert*¹⁰⁾ sind unwirksam als sensibilisierende Antigene im *Middlebrook-Dubos*-Test. Die Tatsache, dass das Polysaccharid I, ein Präparat, das in ähnlicher Weise wie unsere Hämosensitin-Präparate isoliert wurde, sich als inaktiv erwies, ist bemerkenswert. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Fettsäuregruppe, die, wie wir annehmen, mit der sensibilisierenden Wirkung verknüpft ist, nicht vorhanden ist.

Die Polysaccharide S_4 und S_6 von *Watson*³⁰⁾ haben ebenfalls praktisch keine sensibilisierende Wirkung, obwohl sie in ihrer Zusammensetzung unseren α -Hämosensitin-Präparaten nahestehen.

Das Polysaccharid, das von *Asselineau & Lederer*³¹⁾ aus dem Lipopolysaccharid der gereinigten Wachsfraction durch Verseifung gewonnen wurde, war im *Middlebrook-Dubos*-Test sowohl als sensibilisierendes wie als hemmendes Agens inaktiv.

Alle diese Versuche deuten daher darauf hin, dass im α -Hämosensitin ein Verbindungstypus bisher nicht bekannter Struktur vorliegt. Die endgültige Aufklärung des Verbindungstypus konnte in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden, da trotz dem hohen biologischen Aktivitätsgrad unserer Präparate deren Inhomogenität durch ihr elektrophoretisches Verhalten erwiesen wird. Vielleicht könnte diese Inhomogenität teilweise mit der Möglichkeit verknüpft sein, dass

²⁶⁾ *S. V. Boyden & P. Grabar*, Ann. Inst. Pasteur **87**, 257 (1954).

²⁷⁾ *S. V. Boyden*, Nature **171**, 402 (1953).

²⁸⁾ *P. Masucci, K. L. McAlpine & J. T. Glenn*, Amer. Rev. Tuberc. **22**, 669 (1930).

²⁹⁾ *M. Heidelberger & A. E. O. Menzel*, J. biol. Chemistry **118**, 79 (1937).

³⁰⁾ *D. W. Watson*, Thesis, Wisconsin 1941; *D. M. Tennent & D. W. Watson*, J. Immunol. **45**, 179 (1942).

³¹⁾ *J. Asselineau & E. Lederer*, Experientia **7**, 281 (1951).

nur ein Bruchteil des aktiven Materials sensibilisierende Eigenschaften besitzt, der Hauptanteil dagegen nur hemmende Komponenten von gleicher Spezifität im *Middlebrook-Dubos*-Test aufweist. Zonenelektrophoretische Trennversuche auf präparativer Basis, über die wir später berichten werden, scheinen diese Arbeitshypothese zu stützen.

Wir möchten auch an dieser Stelle den Herren Drs. *J. Asselineau*, *E. Lederer*, *P. Masucci* und *D. W. Watson* bestens für die grosszügige Überlassung von Polysaccharidpräparaten danken.

Für aktive Zusammenarbeit danken wir zahlreichen Personen am Staatlichen Seruminstitut, Kopenhagen.

SUMMARY.

Chemical studies have been carried out on polysaccharide fractions from culture filtrates of *M. tuberculosis* which sensitize sheep red cells to haemagglutination by antituberculous sera (*Middlebrook-Dubos* test). The active substance has been called α -haemosensitin. The most highly purified preparations have an optical rotation of $[\alpha]_D^{20} = +72^\circ$ (water) and sensitize red cells to agglutination at a concentration of 0.001 mg/ml. The purity of the products was tested by chemical analysis, paper electrophoresis, boundary electrophoresis and serological means. The electrophoretic data suggest that even the most active preparations are not homogenous, probably because of the presence of more than one structurally closely related type of polysaccharide molecules.

The main component of the purified preparation of α -haemosensitin is polysaccharide, containing 61% arabinose, 25% hexose and 1.3% hexosamine. After alkaline hydrolysis 1% of fatty acid (possibly mycolic acid(s)) was isolated. It was not found possible to free the α -haemosensitin preparations from 4% of protein. It therefore seems likely that a lipopolysaccharide-protein (or peptide) complex is present.

Mild alkaline hydrolysis destroys within 30 minutes the ability of the preparations to sensitize sheep red cells. The ability of the antigen to neutralize antibodies in the haemagglutination inhibition technique is not lost under these conditions. Acid hydrolysis destroys both the red cell sensitizing and the inhibiting activity of the preparations.

Comparisons in the skin test showed the α -haemosensitin to be at least 50 times less potent than PPD-S (48 hours reading).

Tuberculosis Immunization Research Centre,
c/o Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark.