

Zur Chemie des Tuberkulins.

Von

Georg Lockemann.

(Aus der chemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheiten in Berlin;
Direktor: Geh. Ober-Medizinal-Rat Prof. Dr. Gaffky.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. Juli 1911.)

Bald nach Entdeckung des Tuberkulins im Jahre 1890 war das Bestreben von Robert Koch¹⁾ darauf gerichtet, die spezifisch wirksame Substanz aus der Tuberkulinflüssigkeit abzuscheiden und deren chemische Natur aufzuklären. So gewann er durch Fällung mit 60%igem Alkohol das «gereinigte Tuberkulin» als weißes Pulver, welches die spezifische toxische Wirkung in erhöhtem Maße besaß. Da es in wässriger Lösung die gewöhnlichen Eiweißreaktionen gab (Biuret-, Adamkiewicz-, Millon-, Xanthoprotein-Reaktion, Fällungen mit Phosphorwolframsäure, Eisenacetat, Ammonsulfat, Gerbsäure usw.), so mußte es zur Gruppe der Eiweißkörper gerechnet werden. Von den Albumosen, besonders von den sog. Toxalbuminen unterschied sich das Tuberkulin sehr wesentlich durch seine Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen (stark glycerinhaltige Lösungen konnten ohne Beeinträchtigung ihrer Wirksamkeit im Autoklaven stundenlang auf 130—160° erhitzt werden); auch von den Peptonen wich es in mehrfacher Beziehung ab. Koch vermutete unter den Produkten der übrigen pathogenen Bakterien ähnliche Stoffe, die vielleicht zusammen eine besondere Gruppe von Eiweißkörpern bildeten.

In diesem «gereinigten Tuberkulin» waren jedoch immer noch gewisse Bestandteile der eiweißhaltigen Nährlösung ent-

¹⁾ Deutsche mediz. Wochenschrift, Bd. 17 (1891), S. 1189.

halten, von denen es sich nicht trennen ließ. W. Kühne¹⁾ verwendete deswegen als Kulturflüssigkeit eine aus den verschiedensten anorganischen und organischen Bestandteilen künstlich zusammengesetzte Lösung, die keine eigentlichen Eiweißstoffe, sondern nur Spaltungsprodukte von Eiweiß enthielt. Jedoch war es ihm auch auf diese Weise nicht möglich, die aus dem Stoffwechsel der Tuberkelbacillen hervorgehende spezifische Substanz rein zu isolieren und die Frage nach deren chemischem Charakter endgültig zu entscheiden.

Daher griff W. Ruppel²⁾ das Problem auf andere Weise an, indem er nicht die aus den verschiedensten Stoffen zusammengesetzte und die spezifische Substanz enthaltende Kulturflüssigkeit, sondern die in eine fett- oder wachsartige Hülle eingeschlossene Leibessubstanz der Tuberkelbazillen selbst der Untersuchung unterwarf. Besonders verwendete er hierzu das sogenannte T. O., d. h. den wässerigen Extrakt aus den nach R. Kochs³⁾ Zertrümmerungsmethode (Kugelmühle) aufgeschlossenen Tuberkelbacillen, der also keinerlei Beimengungen aus dem Nährboden od. dgl. enthielt. Ruppel konnte aus dem T. O. eine Nucleinsäure isolieren, welcher die charakteristische Tuberkulinwirkung in hohem Maße zu eigen war, und die er daher «Tuberkulinsäure» nannte. Durch weitere Spaltung dieser in den Tuberkelbacillen an ein Protamin, das «Tuberkulosamin», gebundenen Säure gelang es ihm, neben anderen Substanzen ein in hexagonalen Plättchen krystallisierendes Produkt zu gewinnen, welches, aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff bestehend, eine purinartige Verbindung, der eigentliche Träger der Tuberkulinwirkung sein soll. Dieses «Tuberkulosin» konnte Ruppel sowohl in den Bacillen der menschlichen, wie in denen der Rinder- und der Hühner-Tuberkulose nachweisen.

Inzwischen war es durch systematische Untersuchungen

¹⁾ Zeitschrift f. Biologie, N. F., Bd. 11 (1892), S. 24. und Bd. 12 (1893), S. 221.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 26 (1898), S. 218. — „Die Proteine“, Heft IV von Behrings Beiträgen z. experim. Therapie (Marburg 1900).

³⁾ Deutsche medicin. Wochenschr., Bd. 23 (1897), S. 209.

von B. Proskauer und M. Beck¹⁾ im Kochschen Laboratorium gelungen, Nährlösungen ausfindig zu machen, die weder Bouilloneiweiß noch Albumosen oder Peptone oder sonstige Eiweißspaltungsprodukte enthielten und trotzdem ein Fortgedeihen der Tuberkelbacillenkulturen gestatteten. Unter Benutzung einer solchen Nährlösung, die außer dem für das Wachstum des Tuberkelbacillus außerordentlich wichtigen Glycerin als einzige organische Substanzen nur Asparagin und Citronensäure enthält, wurde dann das sogenannte «albumosefreie Tuberkulin» (Tuberkulin A. F.) gewonnen. Somit war auch die Möglichkeit vorhanden, die reinen Stoffwechselprodukte (nicht ausgelaugte Substanzen) der Tuberkelbacillen, die die spezifische Tuberkulinwirkung ausüben, ohne fremdartige Eiweißbeimischung für sich näher zu untersuchen.

Exzellenz Koch, der nach der Rückkehr von seiner letzten großen Reise nach Amerika und Japan im Jahre 1909 die Versuche mit dem albumosenfreien Tuberkulin in großem Maßstabe wieder aufnahm, veranlaßte mich, diese Produkte auf ihr chemisches Verhalten hin zu prüfen.

Die kürzlich erschienene Veröffentlichung von E. Löwenstein und P. Pick,²⁾ die erste Arbeit, die sich mit dem gleichen Problem beschäftigt, ist die Ursache, daß ich hier kurz über diese Versuche berichte. Die Untersuchungen werden zurzeit noch in größerem Maßstabe fortgeführt, die ausführliche Veröffentlichung soll später in größerem Zusammenhange erfolgen.

Zu den Kulturen wurde eine Nährlösung verwendet, die früher von B. Proskauer und M. Beck als besonders geeignet erprobt war (l. c. Tabelle III Nr. 22). Diese Lösung hatte folgende prozentuale Zusammensetzung:

Monokaliumphosphat	0,50 %
Magnesiumsulfat	0,06 %
Magnesiumcitrat	0,25 %
Asparagin	0,50 %
Glycerin	2,00 %
Soda	ca. 0,25 %

¹⁾ Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. 18 (1894), S. 128.

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 31 (1911), S. 142.

Die Nährlösung enthält also als einzige Stickstoffquelle das Asparagin. Die gewöhnlichen Eiweißreaktionen verlaufen daher auch negativ; nur mit Phosphorwolframsäure entsteht ein weißer Niederschlag — Phosphormolybdänsäure bewirkt keine Fällung — und bei der Biuretreaktion erhält man eine blauviolette Färbung, die durch den Asparagingehalt verursacht wird.

Würden also von den übrigen Eiweißreagenzien einige oder mehrere mit dieser Nährlösung, nachdem die Tuberkelbacillen eine gewisse Zeit darauf gezüchtet sind, positive Reaktionen geben, so wäre das ein Zeichen, daß durch die Lebensfähigkeit der Bakterien Substanzen von eiweißartigem Charakter gebildet sind, synthetische Stoffwechselprodukte, die aus den einfachen Bestandteilen der Nährlösung entstanden, in diese zurückkehrten.

Nun zeigte sich tatsächlich, daß das Filtrat einer vierwöchigen Tuberkelkultur mit Phosphormolybdänsäure sowohl wie mit Gerbsäure zwar geringe, aber deutliche Fällungen gab. Daher stellte ich dann Versuche mit Proben von Tuberkulin A. F. verschiedenen Alters an, d. h. mit den Filtraten von Tuberkelkulturen auf eiweißfreier Nährlösung nach verschieden langem Wachstum im Brutschrank bei 37°. Da die Lösungen im Laufe der Zeit durch Verdunstung immer konzentrierter werden, so wurden alle Proben (durch Zusatz von destilliertem Wasser) zunächst auf dieselbe Konzentration gebracht (60% der Anfangskonzentration) und dann die Reaktionen ausgeführt. Zum Vergleich wurde auch die ursprüngliche Nährlösung (auf 60% eingedampft) herangezogen.

Außerdem führte ich Parallelversuche aus mit dem gewöhnlichen aus Glycerinbouillon gewonnenen Tuberkulin und der Glycerinbouillon selbst (beide ebenfalls in der Konzentration von 60%) und mit einem neuerdings von Gordon¹⁾ empfohlenen Präparat «Endotin». Dieses Endotin soll ein eiweißfreies Tuberkulin, «Tuberculinum purum», sein, welches von der «Gesellschaft Tuberculin» in St. Petersburg aus dem

¹⁾ Deutsche mediz. Wochenschr., Bd. 36 (1910), S. 1746.

gewöhnlichen Tuberkulin «durch verhältnismäßig einfache Prozesse, und zwar nach einer Vorbehandlung des fertigen Alt-tuberkulins Koch mit Alkohol, Xylol, Äther, Chloroform, durch nachfolgendes Dekantieren und Zentrifugieren und schließlich durch Behandlung mit heißer, verdünnter Lauge» gewonnen wird. Dadurch werden sämtliche Eiweißkörper aus dem Alt-tuberkulin entfernt, und es soll einzig und allein die spezifische Substanz übrig bleiben, ohne daß sie durch diese Behandlungsweise «irgendwelche Einbuße» erlitten hätte (?!). Das Endotin ist eine farblose, klare Flüssigkeit, welche in vier verschiedenen Konzentrationen, in Ampullen mit je ca. 1 ccm Inhalt eingeschmolzen, in den Handel kommt. Es soll von der Serie A 1 ccm 0,1 mg, von Serie B 1 ccm 1 mg, von Serie C 1 ccm 10 mg, von Serie D 1 ccm 100 mg «Tuberculinum purum» entsprechen.

Somit kamen folgende Proben nebeneinander zur Untersuchung:

I. Asparaginnährlösung, auf 60% eingedampft = **A. N.**

II. Kulturfiltrat von Asparaginnährlösung nach 4 wöchigem Wachstum der Tb-Bacillen (war auf 58% eingedunstet, mit Wasser auf 60% aufgefüllt) = **A. T. 1.**

III. Kulturfiltrat von Asparaginnährlösung nach 8 wöchigem Wachstum der Tb-Bacillen (war auf 27% eingedunstet, mit Wasser auf 60% aufgefüllt) = **A. T. 2.**

IV. Kulturfiltrat von Asparaginnährlösung nach 12 wöchigem Wachstum der Tb-Bacillen (war auf 8,3% eingedunstet, mit Wasser auf 60% aufgefüllt) = **A. T. 3.**

V. Glycerin-Bouillonährlösung auf 60% eingedampft = **B. N.**

VI. Kulturfiltrat von Glycerin-Bouillon nach 10 wöchigem Wachstum der Tb-Bacillen (war auf 31% eingedunstet, mit Wasser auf 60% aufgefüllt) = **B. T.**

VII. Endotin C (1 ccm = 10 mg Tuberculinum purum), mit der gleichen Menge Wasser verdünnt = **End. C.**

Mit diesen Lösungen wurden nun folgende Reaktionen ausgeführt:

1. Kochen und Zusatz von Essigsäure,

2. Zusatz von Salpetersäure und Erhitzen (Xanthoproteinreaktion),
 3. Zusatz von festem Ammonsulfat bis zur Sättigung,
 4. Zusatz von Essigsäure und Kaliumferrocyanid,
 5. Zusatz von Esbachs Reagens,
 6. Zusatz von Gerbsäure (Alménsche Lösung),
 7. Zusatz von Phosphormolybdänsäure,
 8. Zusatz von Quecksilberjodid und Salzsäure,
 9. Zusatz von Quecksilbersulfat und Schwefelsäure (im Überschuß),
 10. Zusatz von etwas Natronlauge und Kupfersulfat (Biuretreaktion),
 11. Zusatz einer Lösung von α -Naphthol in konzentrierter Schwefelsäure (Molischsche Reaktion),
 12. Zusatz einer Mischung von Eisessig und konzentrierter Schwefelsäure (Adamkiewiczische Reaktion),
 13. Zusatz von Millons Reagens und Erhitzen,
 14. Zusatz von Bleiacetat und Natronlauge und Erhitzen.
- Das Ergebnis dieser Reaktionen ist in der Tabelle zusammengestellt.

Dabei bedeuten: — = keine Reaktion,
 + = sehr schwache Fällung (Trübung),
 ++ = etwas stärkere Fällung,
 +++ = starke Fällung.

Aus den in der Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnissen geht deutlich hervor, daß durch das Wachstum der Tuberkelbazillen in die Asparaginnährlösung Stoffe übergehen, welche eiweißartigen Charakter haben. Die Reaktionen mit der Nährlösung A. N. selber verlaufen (abgesehen von der durch Asparagin verursachten Biuretfärbung) sämtlich negativ. In den Kulturflüssigkeiten A. T. 1, 2, 3 dagegen gibt die Kochprobe mit Essigsäure eine Trübung, die mit zunehmendem Alter der Kultur stärker wird. Mit Salpetersäure erhält man beim Erhitzen die Xanthoproteinreaktion, die für einen Gehalt an Phenolgruppen charakteristisch ist. Durch Sättigen mit Ammonsulfat entsteht eine flockige Ausscheidung; Kaliumferrocyanid gibt in essigsaurer Lösung beider

Reagenzien	I. A. N.	II. Asparagin-Nährlösung A. T. 1 4 wöchige Kultur	III. A. T. 2 8 wöchige Kultur	IV. A. T. 3 12 wöchige Kultur	V. Glycerinbouillon B. N.	VI. B. T. 10 wöchige Kultur	VII. Endotin C.
1. Kochen + Essigsäure	—	+	+	+	+	+	—
2. Salpetersäure, erhitzt	— farblos	+	+	+	— gelb	— dunkelgelb	— farblos
3. Festes Ammonsulfat	—	+	+	+	+	+	—
4. Essigsäure + Kaliumferrocyanid	—	—	+	+	+	+	—
5. Esbach-Reagens	—	+	+	+	+	+	—
6. Gerbsäure	—	+	+	+	+	+	—
7. Phosphormolybdänsäure	—	—	+	+	+	+	—
8. Kaliumquecksilberjodid + Salzsäure	—	—	+	+	+	+	—
9. Quecksilbersulfat + Schwefelsäure	—	+	+	+	+	+	—
10. Natronlauge + Kupfersulfat	schwach blauviolett	schwach blauviolett.	schwach blauviolett	schwach blauviolett	rotviolett	schwach rotviolett	farblos
11. Molisch-Reagens	gelblich	rotviolett	dunkel rotviolett	dunkel rotviolett	dunkel rotviolett	dunkel rotviolett	farblos
12. Adamkiewicz-Reagens	farblos.	schwach gelb	hellgelb	gelb	schwach rotviolett	gelb	farblos
13. Millons Reagens	+ weiß	+ rot	+ rot	+ rot	+ rot	+ rot	farblos
14. Bleiacetat + Natronlauge, erhitzt	farblos	farblos	farblos	schwach gelblich	dunkel gelb	schwärzlich	farblos

4 wöchigen Kultur zwar noch keine, aber bei der 8- und 12 wöchigen Kultur eine deutliche Trübung; Esbachs Reagens und Gerbsäure geben Fällungen, die mit zunehmendem Alter der Kulturen stärker werden. Phosphorwolframsäure und Kaliumquecksilberjodid mit Salzsäure geben zuerst in der 8 wöchigen Kultur einen Niederschlag, Quecksilbersulfat mit Schwefelsäure auch schon in der 4 wöchigen Kultur. Die Biuretreaktion ist ohne Bedeutung. Mit Molischs Reagens zeigt sich schon in der 4 wöchigen, stärker in den älteren Kulturen eine Rotviolett-färbung, welche auf die Bildung zuckerartiger Verbindungen hindeutet. Das Adamkiewiczische Reagens, welches mit den echten Eiweißstoffen infolge ihres Indolgehaltes eine rotviolette Färbung gibt, rief hier nur einen gelblichen Farbenton hervor. Dagegen gab Millons Reagens in der Hitze eine Rotfärbung, die wie die Xanthoproteinreaktion für einen Gehalt an phenolartigen Verbindungen charakteristisch ist. Das Erhitzen mit Bleiacetat und Natronlauge, welches den organisch gebundenen Schwefel durch Schwarzfärbung anzeigen sollte, gab nur bei der 12 wöchigen Kultur eine schwache Gelbfärbung.

Die Glycerin-Bouillonlösung B. N. und deren Tuberkelkultur B. T. gaben natürlich durchweg die normalen Eiweißreaktionen. Nur trat bei B. T. mit dem Adamkiewiczischen Reagens keine Rotviolettfärbung (wie bei B. N.) ein, sondern nur eine Gelbfärbung. Dagegen war die Dunkelfärbung beim Erhitzen mit Bleiacetat und Natronlauge bei B. T. stärker als bei B. N.

Das Endotin C. gab keine einzige positive Reaktion. Dieses Präparat enthält also nichts von den Substanzen, die durch das Wachstum der Tuberkelbacillen an die Kulturflüssigkeit abgegeben werden. Ein derartiges Resultat war ja auch nach der von Gordon beschriebenen Darstellungsmethode zu erwarten. Hiermit stimmt überein, daß das Endotin, wie Jochmann und Möllers¹⁾ gezeigt haben, bei exakten physiologischen Versuchen völlig versagt.

¹⁾ Deutsche medicin. Wochenschrift, Bd. 36 (1910), S. 2141; Bd. 37 (1911). S. 126.

Zu welcher Klasse von eiweißartigen Verbindungen die von den Tuberkelbazillen an die Asparaginnährlösung abgegebenen Stoffwechselprodukte zu rechnen sind, das soll erst später auf Grund eines größeren Versuchsmaterials näher besprochen werden. Hier möchte ich nur noch kurz darauf hinweisen, daß die von Löwenstein und Pick (l. c.) veröffentlichten Resultate in einigen Punkten von den meinigen abweichen. Bei ihnen verliefen die Reaktionen mit Ammonsulfat, Kaliumferrocyanid und Millons Reagens, sowie die Kochprobe negativ. Vielleicht sind diese Abweichungen darauf zurückzuführen, daß die genannten Autoren eine andere Nährlösung benutzten. Es ist wohl überhaupt anzunehmen, daß die Art der Zusammensetzung und die synthetische Stufe der Tuberkelstoffwechselprodukte, wie auch Löwenstein und Pick vermuten, bis zu einem gewissen Grade auch von der Art des Nährbodens abhängig sind.
