

UMA 20514

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES  
IMMUNSUPPRESSIVEN SESQUITERPENS OVALICIN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades des Fachbereichs Chemie und  
Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Univer-  
sität München

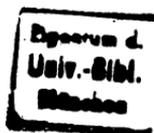
vorgelegt von  
Wolfgang Zimmermann

München 1979

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 1979



Die vorliegende Arbeit wurde von September 1975 bis Juli 1979 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Professor U. Gehring, Heidelberg danke ich für die an Lymphom- und Myelomzellen durchgeführten Untersuchungen.

Thomas Hünig, Institut für Virologie, Universität Würzburg, danke ich herzlich für die Einführung in die Methode der Autoradiographie und die Durchführung von autoradiographischen Analysen.

Theresa Reiter, Petra Graner und Margret Temple, Arbeitskreis Winnacker, Institut für Biochemie der Universität München, halfen mir bei der Kultivierung von 3T6- und HeLa-Zellen. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken.

Hartmut Richter danke ich für die Zusammenarbeit bei Versuchen der zellfreien Proteinsynthese.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die durch Diskussion und praktische Hilfe diese Arbeit unterstützten.



## Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	1
<u>Material</u>	4
1. Mäuse	4
2. Zelllinien	4
3. Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien	4
a) Für die Zellkultur	4
b) Radioaktive Vorstufen für die Zellmarkierung	6
c) Für die Bestimmung der Radioaktivität im säureunlöslichen Zellysat	7
d) Für die Elektrophorese	8
e) Für die Autoradiographie	8
f) Für die DNA-Synthese in isolierten Kernen	8
g) Für die Proteinsynthese an isolierten Ribosomen	9
h) Für den Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Test	9
i) Für die RNA-Synthese in isolierten Kernen	11
4. Geräte	11
a) Für die Reinigung und Sterilisation	11
b) Für den Kulturansatz	11
c) Für die Gewinnung des säureunlöslichen Zellysats	12
d) Für die Gelelektrophorese	12
e) Für die Autoradiographie	12
<u>Methoden</u>	13
1. Reinigung und Sterilisation der Geräte und Gefäße für die Zellkultur	13
2. Lagerung von Flüssigmedium, Mediumzusätzen und Serum für die Zellkultur - Sterilitätskontrolle	13
3. Gewinnung der Lymphozytensuspension aus der Mäusemilz	13
4. Zellkulturen	13
a) Mäusemilzlymphozyten	13
α. Testansatz in kleinen Kulturröhrchen	13
β. Testansatz in Kulturflaschen	13
b) S49.1-Lymphomazellen	15
c) 3T6- und HeLa-Zellen	15
5. Vitalitätsbestimmung	16
6. Mediumswechsel	16

7. Markierung der Zellen mit radioaktiven Vorstufen	17
a) Probenentnahme	18
b) Erhöhung der spezifischen Radioaktivität von [ <sup>3</sup> H] und [ <sup>14</sup> C]Leucin durch Erniedrigung des Leucingehalts des Mediums	18
c) Zusatz der radioaktiven Vorstufen	19
8. Gewinnung des säureunlöslichen Zell- bzw. Kernlysats	19
a) Bestimmung des Thymidin- und Uridineinbaus	19
Testansatz in Kulturröhrchen	19
α. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Mem- branfiltern	19
β. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Glas- faserfiltern	19
Testansatz in Petrischälchen (3T6- und HeLa-Zellen)	20
b) Bestimmung des Leucineinbaus	21
α. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Mem- branfiltern	21
β. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Glas- faserfiltern	21
c) Bestimmung des dTTP-Einbaus in Kerne	21
d) Bestimmung des UTP-Einbaus in Kerne	22
9. Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen	22
a) Zur Analyse von Proteinen	22
α. Probenvorbereitung	22
Lysat ganzer Zellen	22
Kernlysate	23
Kernlysateüberstand	23
β. Herstellung der Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plat- tengelle	23
γ. Auftrennung der Proteine	24
b) Zur Analyse von RNA	24
α. Probenvorbereitung	24
β. Herstellung der Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rund- gele	25
γ. Auftrennung der RNA-Spezies	26
10. Scintillationsmessung	26
a) Filtergebundene Radioaktivität	26
b) Bestimmung der Radioaktivität in Polyacrylamidgelen	30
c) Bestimmung [ <sup>14</sup> C]markierter Lipide	31

$\alpha$ . Gesamtlipid	31
$\beta$ . Lecithinfraktion	31
11. Autoradiographie	32
a) Gele	32
b) Autoradiographie [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin-markierter Lymphozyten	32
$\alpha$ . Präparation der Zellen	32
$\beta$ . Autoradiographie	33
$\gamma$ . Giemsafärbung der Zellen	33
$\delta$ . Auswertung	33
12. Extraktion und Analyse von Lipiden	34
a) Extraktion	34
b) Gewinnung der Lecithinfraktion	34
13. Isolierung von Kernen, Kernüberstand und Chromatin aus Lymphocyten	34
a) Isolierung von Lymphocytenkernen	34
$\alpha$ . Für die Bestimmung der DNA- und RNA-Synthese in isolierten Kernen	35
$\beta$ . Für die Analyse radioaktiv markierter Kernproteine	36
b) Isolierung von radioaktiv markiertem Chromatin aus Lymphocyten	36
c) Ultraschallbehandlung der Kerne	36
14. Messung der DNA-Synthese in isolierten Lymphocytenkernen	36
a) Testansatz	36
b) Charakterisierung des zellfreien Systems	37
15. Proteinsynthese an isolierten Lymphocytenribosomen	38
16. Mikroskopische Bestimmung des Durchmessers von Lymphocyten	39
a) Zellpräparation	39
b) Auswertung	41
17. Bestimmung von Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Aktivität in stimulierten Lymphocyten	41
a) Präparation des 100 000 x g Überstands	41
b) Ornithin-Decarboxylase-Test	42
c) S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Test	43
18. Extraktion von RNA aus stimulierten Lymphocyten	45
19. RNA-Synthese in isolierten Lymphocytenkernen	46
20. DNase-Abbau von radioaktiv markiertem Chromatin	46
21. Auswertung der Versuche und Fehlerrechnung	47

<u>Ergebnisse</u>	49
A Zellselektivität der Ovalicinwirkung	49
1. Werden lymphoide Zellen durch Ovalicin direkt beeinflusst?	49
2. Hemmt Ovalicin den Thymidineinbau in nicht lymphoide Zellen?	51
3. Wirkt Ovalicin selektiv auf Lymphozytensubpopulationen?	54
a) Untersuchung des durch Ovalicin nicht hemmbaren Thymidineinbaus	54
$\alpha$ . Kinetik des Thymidineinbaus Con A-stimulierter Lymphozyten in Gegenwart von Ovalicin	54
$\beta$ . Abhängigkeit von der Thymidinkonzentration	56
$\gamma$ . Einfluß von Ovalicin auf die DNA-Reparatursynthese	58
$\delta$ . Einfluß von Ovalicin auf den Thymidineinbau zwischen der 15. und 30. Stunde nach Con A-Zugabe	60
b) Analyse des Thymidineinbaus einzelner Lymphozyten	64
c) Unterscheiden sich Lymphom- und Myelomzellen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ovalicin?	74
B Ovalicinwirkung und Zellzyklus	80
1. Ovalicinwirkung und 'Zellzyklus' von Mäusemilzzellen	80
a) Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin auf den Thymidineinbau zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Zugabe	80
b) Beeinflussung der Zellvolumenzunahme nach Con A-Stimulation	87
2. Charakterisierung der Hemmung von Lymphomzellen durch Ovalicin	90
a) Geschwindigkeit der Ovalicinwirkung	90
b) Untersuchung der Wirkungsverzögerung	92
$\alpha$ . Gibt es für Ovalicin Aufnahmebarrieren?	94
$\beta$ . Muß Ovalicin metabolisch aktiviert werden?	96
$\gamma$ . Reversibilität der Ovalicinwirkung innerhalb der Verzögerungsphase	98
c) Wirkgeschwindigkeit von Ovalicin auf durch Dibutyryl-cAMP-synchronisierte S49.1-Lymphomzellen	100
C Biochemische Eingrenzung des Wirkorts	105
1. Früher Membranlipidstoffwechsel	105
2. DNA-Synthese isolierter Kerne	107
3. Proteinsynthese	112
a) Vergleich von Protein- und DNA-Synthesehemmung	112

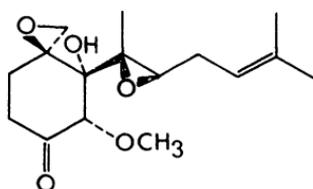
b) Zellfreie Proteinsynthese	114
c) Proteinsynthese kurz nach Mitogenzugabe	118
$\alpha$ . Mitogenstimulation der Proteinsynthese	118
$\beta$ . Geschwindigkeit der Ovalicinwirkung auf den Leucineinbau zwischen der 12. und 14. Stunde nach Con A-Zugabe	121
$\gamma$ . Analyse der früh synthetisierten Proteine (5. - 10. Stunde nach Mitogenzusatz)	121
d) Einfluß auf die Proteinsynthese 30 - 36 Stunden nach Mitogenzusatz	126
$\alpha$ . Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin	126
$\beta$ . Einfluß auf die Synthese einzelner Proteine oder Proteingruppen	126
4. Vergleich mit Hemmstoffen der Protein- und DNA-Synthese	131
5. Polyaminsynthese	138
6. RNA-Synthese	144
a) Kinetik der Hemmung	144
b) Uridinkonzentrationsabhängigkeit der Hemmung	149
c) Größe der Hemmung	152
d) Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin auf den Uridineinbau	152
e) Selektive Hemmung einzelner RNA-Spezies	154
f) Wirkt Ovalicin auf die RNA-Synthese isolierter Kerne?	163
<u>Diskussion</u>	169
A. Zellselektive Wirkung von Ovalicin	169
B. Zellzyklus und Ovalicinwirkung	173
C. Eingrenzung des Wirkorts	178
<u>Anhang</u>	187
Vergleich der Mitogenstimulation von Mäusemilzzellen in Kulturröhrchen und Zellkulturflaschen. - Wirksamkeit von Ovalicin	187
<u>Literaturverzeichnis</u>	193
<u>Zusammenfassung</u>	206
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	208
<u>Lebenslauf</u>	210



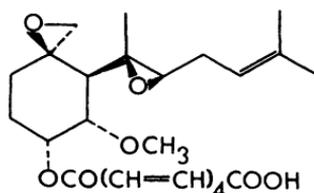
## Einleitung

Ruhende Lymphozyten können durch Pflanzenlektine stimuliert werden, so daß sie in einen metabolisch aktiveren Zustand eintreten. Dabei wird eine Reihe von Reaktionen ausgelöst, die bei Lymphzellen des B-Typs zu Antikörperproduktion, DNA-Synthese und schließlich zur Mitose führen (Ling and Kay, 1975). Lymphozyten sind daher ein interessantes Modellsystem, um die molekularen Vorgänge der Immunreaktion und Zelldifferenzierung zu studieren. Wertvolle Werkzeuge für solche Untersuchungen stellen Hemmstoffe bekannter Spezifität dar, mit deren Hilfe komplexe Reaktionsabläufe aufgegliedert werden können.

Interessant in diesem Zusammenhang ist Ovalicin (1), ein von Sigg und Weber (1968) isoliertes Stoffwechselprodukt aus dem Kulturfiltrat des Ascomyceten *Pseudurotium ovalis* STOLK. Es handelt sich um ein Diepoxid eines Sesquiterpens, das mit Fumagillin (2), einem schon länger be-



1



2

kannten Pilzmetaboliten (Tarbell et al., 1961) eng verwandt ist. Besonderes Interesse verdienen seine in pharmakologischen Untersuchungen an Mäusen (und anderen Spezies) gefundenen immun-suppressiven Eigenschaften (Lazary und Stähelin, 1968).

So unterdrücken 300 mg Ovalicin/kg Maus - i.p. injiziert - die Antikörperbildung nach Injektion von Schafserythrozyten, gemessen am Hämagglutinititer und an der Zahl Plaque-bildender Zellen. Die Hemmung der Immunantwort ist am stärksten,

wenn Ovalicin einen Tag nach der Immunisierung injiziert wird (Lazary und Stähelin, 1969; Arrenbrecht und Lazary, 1970). Das Toxin beeinträchtigt ebenfalls die zellulären Immunreaktionen. So werden homologe Hauttransplantate bei Mäusen in Gegenwart des Hemmstoffs signifikant länger toleriert; die Häufigkeit, mit der experimentelle allergische Encephalomyelitis bei Ratten auftritt und die Intensität der Tuberkulinreaktion bei Meerschweinchen sind reduziert (Borel et al., 1974). Die immunsuppressive Wirkung von Ovalicin ist dabei wahrscheinlich nicht durch eine allgemeine Zytotoxizität verursacht, da der Hemmstoff die Zahl der Mitosen in Milzen immunisierter Mäuse stark erniedrigt, während der Mitoseindex im Darmepithel nicht beeinflusst wird. (Lazary und Stähelin, 1968).

Diese im Tierexperiment gefundenen bemerkenswerten Eigenschaften des Toxins legten nahe, die Wirkung von Ovalicin auf Lymphozytenkulturen zu untersuchen. Überraschenderweise hemmte Ovalicin in diesem System die Proliferation ConA-stimulierter Mäuse-Milzzellen, gemessen am Thymidineinbau in säureunlösliches Zellysat, bei der außerordentlich niedrigen Konzentration von  $2 \times 10^{-10}$  Mol/l halbmaximal (Weiner, 1976; Hartmann et al., 1978). Allerdings ist die Hemmung der DNA-Synthese selbst bei viel höheren Toxinkonzentrationen nicht vollständig. Da dies auf eine unterschiedliche Sensitivität der in einer Milzsuspension vorhandenen Lymphozytensubpopulationen hinwies, wurden die Untersuchungen von Weiner (1976) auch auf anders zusammengesetzte Lymphozytensysteme ausgedehnt. Ovalicin hemmt den durch Mitogene unterschiedlicher Spezifität (Lipopolysaccharid, Concanavalin A; Andersson et al., 1972) stimulierten Thymidineinbau nicht nur in Milzzellen, sondern auch in Zellen aus Mäuselymphknoten, in normalen und hydrocortisonresistenten Thymozyten. In allen Fällen bleibt jedoch ein durch Ovalicin nicht hemmbarer Thymidineinbau von wechselnder Größe (Weiner, 1976). Wahrscheinlich ist die DNA-Synthese jedoch nicht der direkte Angriffsort von Ovalicin, da der Hemmstoff 20 Stunden nach ConA-Stimulation zugesetzt, den Thymidineinbau der durch das Mitogen partiell synchronisierten Milzzellen zwischen der 24. und 36. Stunde nicht beeinflusst (s.o.).

Die außergewöhnlich große, sonst nur bei Hormonen gefundene Wirksamkeit dieses Hemmstoffs gegenüber Lymphozyten, die eine sehr spezifische Wechselwirkung mit einem Rezeptor vermuten läßt, veranlaßte uns, seine Wirkungsweise näher zu untersuchen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die im Tierexperiment gefundene selektive Wirkung auf Immunozyten (s.o.) in Zellkultur zu überprüfen und den molekularen Wirkort von Ovalicin zu finden oder zumindest einzugrenzen. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit der Einfluß des Toxins auf die Zellvermehrung oder den Thymidineinbau lymphoider und nicht lymphoider Zelllinien untersucht. In diesem Zusammenhang wurde auch versucht, die Ursache der Unvollständigkeit der DNA-Synthesehemmung zu klären. Der zweite Abschnitt ist der Frage nach der zeitlichen Wirkung im Zellzyklus gewidmet, während im dritten Abschnitt geprüft wurde, ob wichtige Schlüsselreaktionen der Zellvermehrung von Ovalicin beeinflußt werden.

## Material

### 1. Mäuse

B6D2 (F<sub>1</sub>-Generation aus C57Bl/6 und DBA/2 Inzuchtstämmen), weibliche Tiere, 2 - 10 Monate alt (Bomholtgard, Ry, Dänemark)

### 2. Zelllinien

- a) S49.1-Lymphomazellen (ursprünglich von Horibata und Harris (1970) aus einer BALB/c/St-Maus isoliert) und der Subklon S49.1 IG.3 wurden freundlicherweise von U. Gehring, Heidelberg zur Verfügung gestellt.
- b) Cl.18-(aus einer C3H-Maus, Horibata und Harris, 1970) und RPC5.4-Myelomazellen (aus einer BALB/c-Maus) von U. Gehring verwendet.
- c) HeLa- und 3T6-Zellen erhielten wir von Prof. E. Winnacker, München.

### 3. Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien von Merck, Darmstadt des Reinheitsgrads p.A. verwendet. Alle Lösungen wurden in destilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt (Ausnahme: Trichloressigsäurelösungen) und bei Verwendung für die Zellkultur sterilfiltriert.

#### a) Für die Zellkulturen

BSS-Puffer (Hank's balanced salt solution): Hergestellt wie in Weiner (1976) beschrieben.

Kulturmedien:

Eagle's Minimal Medium (für Lymphozyten): Autopow MEM ohne L-Leucin (Nr. SF-108 C), Sonderanfertigung von Flow Laboratories, Bonn, angesetzt mit destilliertem Wasser nach Vorschrift des Herstellers, autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Normalmedium wurde durch Zugabe von 52 mg/l L-Leucin (Baker, 'Baker Grade', Groß-Gerau) erhalten.

Dulbecco's Medium (ohne essentielle Aminosäuren) für S49.1-, HeLa- und 3T6-Zellen wurde freundlicherweise vom Arbeitskreis

Winnacker, Institut für Biochemie München zur Verfügung gestellt. Das Medium enthielt zusätzlich pro 1 0.3 g Penicillin, 0.1 g Streptomycin und 25 000 E Moronal (Antimykoticum).

Trypsin-Lösung: 0.25 % Trypsin (Sigma, Taufkirchen)  
0.5 g Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)  
ad 1 l PBS-d.

PBS-d: s. PBS (Material 3 c) jedoch ohne  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ .

Vor Gebrauch wurde Eagle's Minimal Medium (MEM), wie in Weiner (1976) beschrieben, supplementiert. Dem Medium wurde, wenn nicht anders erwähnt, 2.5 % (Nr. 4-155 M), in Ausnahmefällen (siehe Legenden) 5 % (Nr. 4-055 E) fötales Kälberserum (Flow Laboratories, Bonn), jeweils hitzeinaktiviert zugesetzt.

Concanavalin (ConA) (Pharmacia, Fine Chemicals, Frankfurt): ConA wurde unter sterilen Bedingungen abgewogen, zu 1 mg/ml bzw. 200 µg/ml in sterilem BSS gelöst und für nur einen Versuch verwendet (Lösung nicht sterilfiltriert).

Mercaptoäthanol (Fluka, Buchs, Schweiz): in sterilem BSS zu einer Konzentration von  $10^{-2}$  M bzw.  $2 \times 10^{-3}$  M gelöst und nur für einen Versuch verwendet (Stammlösungen nicht sterilfiltriert).

Trypanblau (KEPEC Chemische Fabrik, Siegburg)

Gasgemisch (Linde, München): 10 %  $\text{CO}_2$ , 7 %  $\text{O}_2$ , 83 %  $\text{N}_2$

Folgende Hemmstoffstammlösungen wurden verwendet:

Ovalicin (MW 296): freundlicherweise von Dr. H. P. Sigg, Sandoz AG, Basel zur Verfügung gestellt. 50 µg/ml in BSS bzw. 10 µg/ml für zellfreie Systeme in Wasser bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt (nach dem Auftauen auf gebildete Kristalle achten!)

Hydroxyharnstoff (MW 76; Serva, Heidelberg): 2 mg/ml BSS

Cytosinarabinosid (MW 280; Serva, Heidelberg): 2 mM in BSS

Cycloheximid (MW 281; Boehringer, Mannheim): 200  $\mu$ M in BSS  
Verrucarin A (MW 502; freundlicherweise von Dr. H. P. Sigg, Sandoz AG, Basel zur Verfügung gestellt): 10  $\mu$ g/ml BSS (Aufbewahrung bei 4° C)

$\alpha$ -Amanitin: (Geschenk von Th. Wieland, Heidelberg): 167 mg/ml Wasser (frisch angesetzt)

Actinomycin D (MW 1256; Sigma, Taufkirchen Grade I):  
100  $\mu$ g/ml BSS (mit 1 % Methanol) bzw. Wasser (mit 1 % Methanol)

Methylglyoxal-bis-( uanylhydrazon)-dichlorid-monohydrat  
(MW 275; Aldrich-Europe, Nettetal): 18.3  $\mu$ g/ml Wasser

Na-N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-Dibutyryl-adenosin3'5'-cyclisches-monophosphat  
(MW mit 1.5 M H<sub>2</sub>O: 518; Sigma, Taufkirchen, Grade II):  
20 mM in BSS

Theophillin (MW 180; Sigma, Taufkirchen): 40 mM in BSS

Die Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei - 20° C aufbewahrt.

#### b) Radioaktive Vorstufen für die Zellmarkierung

Die radioaktiven Stammlösungen wurden nach Angaben des Herstellers gelagert und von Zeit zu Zeit auf ihre Reinheit untersucht. [<sup>3</sup>H] Thymidin (6.7 Ci/mMol) wurde maximal 6 Monate verwendet. Durch Zugabe der entsprechenden unmarkierten Verbindungen wurden die in den Legenden angegebenen spezifischen Radioaktivitäten eingestellt.

[Methyl-<sup>3</sup>H] Thymidin: Schwarz/Mann, Becton Dickinson, Heidelberg; spezifische Aktivität: 6 Ci/mMol, 1 mCi/ml

New England Nuclear, Frankfurt; spezifische Aktivität:  
6.7 Ci/mMol, 1 mCi/ml

[2-<sup>14</sup>C] Thymidin: Amersham Buchler, Braunschweig; spezifische Aktivität: 0.062 Ci/mMol, 50  $\mu$ Ci/ml

[5-<sup>3</sup>H] Uridin: Schwarz/Mann, Becton Dickinson, Heidelberg;  
spezifische Aktivität: 2 Ci/mMol, 1 mCi/ml

[2-<sup>14</sup>C] Uridin: Schwarz/Mann, Becton Dickinson, Heidelberg;  
spezifische Aktivität: 0.058 Ci/mMol, 10 µCi/ml

[4,5-<sup>3</sup>H] Leucin: Amersham Buchler, Braunschweig; spezifische  
Aktivität: 58 Ci/mMol, 10 mCi/ml

[U-<sup>14</sup>C] Leucin: Schwarz/Mann, Becton Dickinson, Heidelberg;  
spezifische Aktivität: 0.309 Ci/mMol, 50 µCi/ml

[1-<sup>14</sup>C] Na-Acetat: Amersham Buchler, Braunschweig; spezifi-  
sche Aktivität: 0.056 Ci/mMol, 1 mCi in 2 ml sterilem Was-  
ser gelöst.

c) Für die Bestimmung der Radioaktivität im säureunlöslichen  
Zellysat

Phosphate Buffered Saline mit Azid (= PBS-Azid:

7.1 g NaCl  
1.0 g NaN<sub>3</sub>  
2.98 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O  
0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.2 g KCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
resultierender pH 7.4)

PBS-Puffer: s. PBS-Azid, jedoch ohne NaN<sub>3</sub>

Physiologische Kochsalzlösung: 0.85 % NaCl in destillier-  
tem Wasser

1,4-Bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol(POPOP), 2,5-Diphenyl-  
oxazol (PPO), (Zinsser, Frankfurt)

d) Für die Elektrophorese

Elektrodenpuffer für die Plattengele:

3.03 g Tris-(hydroxymethyl)amino-methan

(= Tris; Fluka, Buchs, Schweiz)

14.52 g Glycin

10 ml 10 % Natriumdodecylsulfatlösung

(Serva, Heidelberg)

ad 1 l H<sub>2</sub>O; resultierender pH 8.4

Probenpuffer: 3 g Natriumdodecylsulfat (Serva, Heidelberg)

6.5 ml 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 6.8)

ad 95 ml H<sub>2</sub>O

Anschließend wurden zugesetzt:

10 ml 0.1 % Bromphenolblaulösung

10 ml Glycerin

Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 0.95 ml

dieser Lösung 0.05 ml Mercaptoäthanol gegeben.

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-

Tetramethyläthylendiamin (TMED); (Serva, Heidelberg)

Dimethylaminopropionitril (Merck-Schuchardt, München)

Ethidiumbromid (Calbiochem, Los Angeles, USA)

Agarose (A 6877), (Sigma, Taufkirchen)

e) Für die Autoradiographie

Du Pont Cronex 2, X-Ray Screen Film, NIF 200 (13 x 18 cm)

Agfa-Entwickler 6150

Agfa-Gevaert Röntgenschnellfixierbad

Für die Autoradiographie [<sup>14</sup>C]markierter Lymphozyten:

Materialien wie in Hünig (1973) beschrieben.

f) Für die DNA-Synthese in isolierten Kernen

Die Testmischung (0.1 ml/Test) wurde wie folgt zusammenpipettiert:

- 0.02 ml dATP, dGTP und dCTP (Boehringer, Mannheim)-Mischung aus gleichen Teilen 7.5 mM, mit NaOH neutralisierten Stammlösungen zusammenpipettiert.
- 0.01 ml ATP (50 mM), Phosphoenolpyruvat (125 mM), (Boehringer, Mannheim; eigene Herstellung)
- 0.02 ml [<sup>3</sup>H] dTTP (New England Nuclear, Frankfurt), spezifische Aktivität: 18.1 Ci/mMol; vor Verwendung wurde der Stammlösung ein Aliquot entnommen, die äthanolhaltige Lösung unter N<sub>2</sub> einrotiert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit unmarkiertem dTTP (Boehringer, Mannheim) zu einer resultierenden spezifischen Aktivität von 0.1 Ci/mMol (2 µCi/0.02 ml) versetzt.
- 0.01 ml Pyruvatkinase (Boehringer, Mannheim) in HEPES-Puffer (s.u.), jeweils frisch angesetzt.
- 0.02 ml HEPES-Puffer  
380 mM HEPES (= N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure; Serva, Heidelberg)  
1.25 M Saccharose (reinst, DAB 7, Merck, Darmstadt)  
1.0 M NaCl  
0.125 M MgCl<sub>2</sub>  
0.125 M EGTA (= Äthylenglycol-bis-(β-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure)
- 0.01 ml Dithiothreitol (Sigma, Taufkirchen); die Stammlösung (20 mM) wurde jeweils frisch angesetzt.
- 0.01 ml H<sub>2</sub>O oder Ovalicinlösung (s. Material 3a)  
Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen bei - 20° C aufbewahrt.

g) Für die Proteinsynthese an isolierten Ribosomen

Wie in Richter (1977) beschrieben.

h) Für den Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Test

Alle Mischungen wurden bei - 20° C aufbewahrt.

Ornithin-Decarboxylase-Test (Endvolumen: 0.25 ml):

Folgende Mischungen wurden kurz vor Testbeginn zusammenpipetiert:

0.10 ml Test-Puffer pH 7.2

250 mM Glycylglycin (Sigma, Taufkirchen)

0.5 mM Pyridoxal 5'-phosphat (Sigma, Taufkirchen)

10 mM Dithioerythritol (Sigma, Taufkirchen)

0.02 ml DL-[1-<sup>14</sup>C]Ornithin (The Radiochemical Centre, Amersham, Braunschweig), spezifische Aktivität:

0.059 Ci/mMol; 50 µCi/ml; zur Erniedrigung der nicht-

enzymatischen Kontrollaktivität wurde die Stammlösung

im Vakuum unter N<sub>2</sub> einrotiert und mit 10 mM HCl re-

konstituiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens 4 mM

(-)Ornithin (Sigma, Taufkirchen) wurde eine spezifische

Aktivität von 5.6 mCi/mMol eingestellt.

0.03 ml H<sub>2</sub>O oder Zusätze (s. Tab. 15)

0.10 ml Zellextrakt (s. Methode 17a)

S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Test (Endvolumen: 0.2 ml):

Folgende Mischungen wurden kurz vor Testbeginn zusammenpipetiert:

0.05 ml Test-Puffer pH 7.2

400 mM Glycylglycin

20 mM Dithioerythritol

2 mM Putrescin (Sigma, Taufkirchen), entfällt bei Proben ohne Putrescin (s. Tab. 16)

0.02 ml S-Adenosyl-L-[carboxyl-<sup>14</sup>C]methionin (The Radiochemical Centre, Amersham, Braunschweig), spezifische Aktivität: 0.058 Ci/mMol; 50 µCi/ml; zur Erniedrigung

der spezifischen Aktivität wurde die Stammlösung mit

dem vierfachen Volumen 0.44 mM unmarkierten S-Adeno-

sylmethionins (Boehringer, Mannheim) versetzt (resultierende spezifische Aktivität: 0.016 Ci/mMol).

0.03 ml H<sub>2</sub>O oder Zusätze (s. Tab. 16)

0.10 ml Zellextrakt (s. Methode 17a)

1) Für die RNA-Synthese in isolierten Kernen

Kurz vor Testbeginn wurden folgende Mischungen zusammenpipetiert (Endvolumen: 0.25 ml):

0.05 ml CTP, GTP, ATP (Boehringer, Mannheim) je 0.3 mM und Phosphoenolpyruvat (16 mM) in Inkubationspuffer (2 x konz.) Inkubationspuffer (nach Land und Schäfer, 1977):

50 mM Tris-HCl pH 7.4

5 mM MgCl<sub>2</sub>

60 mM KCl

1 mM Dithioerythritol

10 % (v/v) Glyzerin (reinst, wasserfrei, Merck, Darmstadt)

1 % (w/v) Rinderserumalbumin (Behringwerke, München)

0.01 ml Pyruvatkinase (Boehringer, Mannheim); 20 µg/0.01 ml

0.01 ml [<sup>3</sup>H]UTP (Schwarz/Mann, Becton Dickinson, Heidelberg), spezifische Aktivität: 18 Ci/mMol; 0.5 mCi/ml

Zum Gebrauch wurde die äthanolhaltige Stammlösung bei Raumtemperatur einrotiert und mit unmarkiertem UTP (Boehringer, Mannheim) zu einer spezifischen Aktivität von 1.2 Ci/mMol, 9 µCi/10 µl verdünnt.

0.03 ml H<sub>2</sub>O oder Zusätze (s. Fig. 44)

0.15 ml Kernsuspension (s. Methode 13a, 19)

4. Geräte

a) Für die Reinigung und Sterilisation

Wie in Weiner (1976) beschrieben.

b) Für den Kulturanatz

Wie in Weiner (1976) beschrieben. Zusätzlich wurden verwendet: Kulturflaschen (Falcon-Plastics, Los Angeles, über LS-Service bzw. Alpha-Labortechnik, München bezogen), 250 ml, 75 cm<sup>2</sup> (Nr. 3024), 25 cm<sup>2</sup> (Nr. 3012 und 3013)

Zählkammern: (Helber, Albert und Sass), 0.02 mm Tiefe, 1/400 mm<sup>2</sup>; (Thoma), 0.1 mm Tiefe, 1/400 mm<sup>2</sup>

CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus, Hanau)

c) Für die Gewinnung des säureunlöslichen Zellysats

Wie in Richter (1977) beschrieben. Zusätzlich wurden verwendet:

Glasfaserfilter GF/C, 2.5 cm Ø (Whatman, bezogen über Vetter KG, Wiesloch)

Absaugvorrichtung aus Metall (New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA)

Branson Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danburg, USA, bezogen über Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

d) Für die Gelelektrophorese

Apparatur für die Rundgelelektrophorese (Feinmechanische Werkstatt, Institut für Biochemie, München)

Spannungsquelle: Philipps-Gerät PE 1532; Electrophoresis Power Supply, Type 264 (Chem Lab Instruments, Essex, England)

e) Für die Autoradiographie

Röntgenfilmbelichtungskammer (Barthel KG, München)

## Methoden

### 1. Reinigung und Sterilisation der Geräte und Gefäße für die Zellkultur

Wie in Weiner (1976) beschrieben.

### 2. Lagerung von Flüssigmedium, Mediumzusätzen und Serum für die Zellkultur - Sterilitätskontrolle

Wie in Weiner (1976) beschrieben; ConA-Stammlösungen wurden jedoch immer frisch angesetzt (s. Material 3a)

### 3. Gewinnung der Lymphozytensuspension aus der Mäusemilz

Wie in Richter (1977) beschrieben. Die Milzen von maximal 3 Mäusen wurden vereinigt und die Zellen nach Entfernung der Zellklumpen durch 5-minütige Zentrifugation (500 x g, Christ Zentrifuge, 4°C) gesammelt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 10 ml gebrauchsfertigem Kulturmedium suspendiert.

### 4. Zellkulturen

Alle Operationen außerhalb der Klimakammer, die steriles Arbeiten erforderten, wurden an einer 'clean bench' (Laminar Flow) durchgeführt.

#### a) Mäuselymphozyten

α. Testansatz in kleinen Kulturröhrchen:

Wie in Weiner (1976), jedoch ohne Vorinkubation.

β. Testansatz in Kulturflaschen:

Je nach Zellbedarf wurden die Lymphozyten in großen (75 cm<sup>2</sup>) oder kleinen (25 cm<sup>2</sup>) Kulturflaschen bzw. in Petrischälchen stimuliert. Das Volumen der Zellsuspension wurde so bemessen, daß in allen Kulturgefäßen das Medium ca. 6 mm hoch stand (Petrischälchen jedoch ca. 3 mm).

Kulturflasche		max. Volumen des Kulturmediums
Große Flasche	liegend	4,5 ml
	stehend	15 ml
Kleine Flasche		
Nr. 3012, ab- gefeilte Stege	stehend	4 ml
	liegend	15 ml
Nr. 3013	liegend	15 ml
	stehend	4,5 ml

35 ml gebrauchsfertiges Medium (s. Material 3a) wurde mit einer 50 ml Pipette in eine große Kulturflasche pipettiert und die Flasche mit lose aufgeschraubtem Verschluss in der Kulturkammer eine Minute lang begast (Gasgemisch s.u.). Nach vollständigem Gasaustausch bei Raumtemperatur (Dauer ca. 3 h; Indikatorfarbe: gelborange) wurde, wenn nicht anders angegeben, ConA (Endkonzentration: 1 µg/ml), 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) und Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M) in BSS bzw. ein der Toxinlösung entsprechendes Volumen BSS zugesetzt (max. BSS-Gehalt 1,7 % des Endvolumens) und der Versuch durch Zugabe von  $100 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Medium ( $37^\circ\text{C}$ ) gestartet (resultierende Zelldichte:  $2 \times 10^6$  Zellen/ml). War eine spätere Ovalicinzugabe erforderlich, wurde der Hemmstoff in BSS (max. 0,5 % Volumen) bzw. die gleiche Menge BSS den Kulturen (Kontrollen) zugesetzt und um die Lymphozyten möglichst wenig zu stören (s. Material 7a), durch vorsichtiges Umschwenken mit dem Medium vermischt. Die Konzentrationsangaben wurden auf ein um 10 % größeres Endvolumen bezogen; dies wurde in der Regel erst nach Probeentnahme und Zusatz des Pulsmediums erreicht. Das Volumen von Medium und Zellsuspension wurde in kleineren Ansätzen (s. o.) entsprechend reduziert. Während der Inkubation wurden die Kulturen in einer durch feuchtes Haushaltspapier wassergesättigten Atmosphäre aus 10 %  $\text{CO}_2$ , 7 %  $\text{O}_2$  und 83 %  $\text{N}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  in einer gasdichten Kammer gehalten. Um durch die Zellisolierung bedingte Aktivierung der Lymphozyten abklingen zu lassen (vgl. Weiner, 1976) und definierte Temperaturbedingungen für die Mitogenstimulation zu erhalten, wurden die Zellen in den meisten

Experimenten vorinkubiert. Hierzu wurden die Zellen im begasteten Kulturmedium ( $2 \times 10^6$ /ml) rund 12 h (genaue Angaben s. einzelne Legenden) ohne Zusätze belassen. Dann wurden ConA, Mercaptoäthanol und gegebenenfalls Hemmstoff in den oben bzw. in den Legenden angegebenen Konzentrationen in der Klimakammer bei  $37^\circ$  C zugesetzt und mit temperiertem Gasgemisch wieder begast. Unter diesen Bedingungen stimulierte Milzzellen zeigen rund dreiviertel des zu gleichen Zeiten nach ConA- und Mercaptoäthanolzugabe gemessen [ $^3\text{H}$ ] Thymidineinbaus von Zellen, die sofort nach Isolierung - um besser vergleichen zu können - ebenfalls in auf  $37^\circ$  C temperiertem Kulturmedium stimuliert wurden (ohne Beleg; vgl. Weiner, 1976). In allen Experimenten mit Milzzellen beginnt der Versuch mit Zugabe von ConA.

b) S49.1-Lymphomazellen (vgl. Horibata und Harris, 1970)

Die S49.1-Zellen wurden in Dulbecco's Medium (ohne nicht-essentiellen Aminosäuren) mit 10 % fötalem Kälberserum in einer feuchten Atmosphäre aus 10 %  $\text{CO}_2$ , 7 %  $\text{O}_2$  und 83 %  $\text{N}_2$  bei  $37^\circ$  C kultiviert. Zum Aufrechterhalten der Kultur wurde die Zellsuspension alle 2 - 3 Tage 1:10 oder 1:20 mit frischem Medium (temperiert und begast) verdünnt. Die Experimente wurden in  $25 \text{ cm}^2$  oder  $75 \text{ cm}^2$  Falconflaschen, die 3 - 15 bzw. 20 - 50 ml der Zellsuspension enthielten, durchgeführt. Um asynchrones Wachstum zu erzielen, wurde die Zellsuspension spätestens 4 - 18 h vor Beginn des Experiments ( $t = 0$ ) mit frischem Medium auf eine Ausgangszelldichte von  $0.15 - 0.3 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt, so daß während des Versuchs die kritische Zelldichte von  $1.5 - 2.0 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschritten wurde. Hemmstoffe wurden in BSS (max. Anteil am Kulturmedium 1 %) zugesetzt.

c) 3T6- und HeLa-Zellen

Die Zellsuspensionen wurden freundlicherweise von P. Graner, M. Temple und T. Reiter hergestellt: Die Zellen wurden in  $75 \text{ cm}^2$  Falconflaschen in 40 ml Dulbecco's Medium (ohne nicht-essentielle Aminosäuren) mit 10 % neugeborenes Kälberserum gezogen. Zur Gewinnung einer Zellsuspension wurde das alte

Medium abdekantiert, der Zellrasen mit einem gleichen Volumen PBS-d (Raumtemperatur) gewaschen und durch Inkubation mit 2 ml Trypsinlösung (5 min bei 25 - 37°C) vom Boden der Flasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein verschließbares Plastikzentrifugenröhrchen mit 1 ml Serum (s. o.) überführt und zentrifugiert (Zentrifuge: Wigfug, Stockholm, Schweden; 5 min., 1200 UpM). Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Zellpellet in 2 ml Kulturmedium durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer 5 ml Pipette suspendiert. Die Zellsuspensionen wurden mit frischem Medium weiter verdünnt (HeLa 1 : 250; 3T6 1 : 750), in 2 ml Portionen in Petrischalen (35 mm Ø) ausgesät (resultierende Zelldichte: HeLa 40 %, 3T6 13 % der bei der Kultivierung gewöhnlich erzielten Zelldichte) und in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>) bei 37°C inkubiert. 6 h (HeLa) bzw. 9 h (3T6) nach Aussaat der Zellen wurden 20 µl Ovalicidlösung (resultierende Toxinkonzentrationen s. Fig. 7, 8) oder BSS zugesetzt.

##### 5. Vitalitätsbestimmung

Die eisgekühlten S49.1- oder Lymphozytensuspensionen (Probenentnahme wie in Methode 7a beschrieben) wurden 1 : 1 bzw. 2 : 1 in einem Eppendorfgeläß mit eiskalter Trypanblaulösung (0.3 % in 0.85 % NaCl-Lösung) versetzt und die besonders bei Lymphozyten nach Con A-Stimulation entstehenden Zellaggregate durch mehrmaliges Aufsaugen mit der Pasteurpipette dissoziiert. Die Gesamtzellzahl und der Anteil blaugefärbter Zellen ('tote' Zellen) wurde im Phasenkontrastmikroskop bei 125-facher Vergrößerung in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt. Zur Kontrolle wurden die morphologisch normalen Zellen ausgezählt. Im Fall der S49.1-Zellen betrug der Anteil vitaler Zellen ca. 98 %.

##### 6. Mediumswechsel (Waschverfahren)

Zur Erhöhung der spezifischen Radioaktivität [<sup>14</sup>C]Leucin und [<sup>3</sup>H]Leucin (vgl. Fig. 28, 32) bzw. zur Entfernung von Hemmstoffen (vgl. Fig. 25, 26) mußte das Kulturmedium gewechselt werden. Alle dazu erforderlichen Manipulationen erfolgten bei 37°C in

der Klimakammer. Die benötigten Kulturgefäße und Medien (ggf. mit Zusätzen wie Hemmstoffen und radioaktiven Vorläufern) wurden 1 - 2 Stunden vor Gebrauch temperiert und begast. Zur Erniedrigung der Leucinkonzentration im Medium wurde den Zellkulturflaschen je 2 x 0.9 ml Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a), 2 ml Kulturmedium (mit 2-Mercaptoäthanol, jedoch ohne Leucin) zugesetzt (nur in dem in Fig. 28 dargestellten Versuch) und 5 - 10 min lang bei 140 x g (Hettich-Rotixa-Laborzentrifuge: 1000 UpM) in kleinen Kulturröhrchen zentrifugiert. Die Verschlusskappen der Röhrchen waren dabei fest angedrückt, um raschen Gasaustausch und damit Alkalisierung des Mediums zu vermeiden. Der Überstand wurde mit einer gleichmäßigen, zügigen Bewegung dekantiert und der letzte Tropfen Mediums abgeschüttelt. Unter diesen Bedingungen blieben 0.1 ml Medium am Röhrchen haften (Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von [ $^{14}\text{C}$ ]- und [ $^3\text{H}$ ]Leucin s. Methode 7b). Sofort anschließend wurden die Zellen mit 2 ml komplettem Medium (mit allen Zusätzen wie vor dem Waschvorgang, jedoch ohne Leucin) mit oder ohne Ovalicin gewaschen (Zentrifugation s.o.; nur in dem in Fig. 32 dargestellten Versuch) und rasch 1 ml komplettes Medium (mit allen Zusätzen wie vor dem Waschvorgang, jedoch ohne Leucin) mit radioaktiv markiertem Leucin zugesetzt.

Zum Auswaschen von Hemmstoffen aus S49.1-Zellkulturen wurde die aufgewirbelte Zellsuspension vollständig in 50 ml Plastikröhrchen mit Deckel überführt und wie oben zentrifugiert. Nach Ablesen des Überstands wurde das Zellpellet im gleichen Volumen frischen Mediums (gegebenenfalls mit Ovalicin s. Fig. 25) resuspendiert, erneut wie oben zentrifugiert und im gleichen Volumen frischen Mediums ohne Hemmstoff in neuen Kulturflaschen inkubiert.

#### 7. Markierung der Zellen mit radioaktiven Vorstufen

Alle Geräte und Medien wurden rechtzeitig (s. Methode 6) temperiert und/oder begast. Alle Operationen erfolgten, wenn nicht anders vermerkt, bei 37°C in der Klimakammer.

a) Probenentnahme

Zur Bestimmung des Einbaus von [ $^3\text{H}$ ]- oder [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Leucin, Thymidin oder Uridin in Zellen bzw. säureunlösliches Zellysat wurden die Lymphozyten bzw. S49.1-Zellen zu den in den einzelnen Figuren angegebenen Zeiten durch fünfmaliges Umschwenken suspendiert, je Kulturflasche 2 x 0.9 ml (Tab. 19 und Fig. 23 nur 1 x 0.9 ml) der Zellsuspension mit einer 2 ml Pipette entnommen und in kleine Kulturröhrchen überführt (zum Problem der Zellrasenbildung bei Lymphozyten s. Anhang). Bei der Meßung von Einbaukinetiken mußte die Entnahme mehrmals wiederholt werden. Auf diese Weise konnte bis zu 50 % der Lymphozytensuspension entnommen werden, ohne das Zellwachstum signifikant zu verändern (vgl. dazu Tab. 6). Weder der Zeitpunkt der Probenentnahme oder Pufferzugabe (vgl. Fig. 29, 31, 41), noch ihre Häufigkeit beeinträchtigen die Zellstimulation (ohne Beleg) oder Proliferation (vgl. Fig. 26).

b) Erhöhung der spezifischen Radioaktivität von [ $^3\text{H}$ ] und [ $^{14}\text{C}$ ] Leucin durch Erniedrigung des Leucingehalts des Mediums

Da der hohe Gehalt an 'kaltem' Leucin im normalen Kulturmedium (52 mg/l) wegen der daraus resultierenden geringen spezifischen Radioaktivität von [ $^3\text{H}$ ] oder [ $^{14}\text{C}$ ] Leucin eine starke Markierung der Proteine verhinderte, wurde der Leucingehalt des Mediums entweder durch Waschen der Zellen mit Leucin-freiem Medium erniedrigt (s. Fig. 28, 32; vgl. Methode 6) oder die Zellen wurden von vornherein im Medium mit geringem Leucingehalt (meist 22 % des Normalgehalts) kultiviert. Für die Berechnung der resultierenden spezifischen Radioaktivität wurde angenommen, daß das für das Kulturmedium benötigte fötale Kälberserum wie humanes Plasma 10 µg Leucin pro ml enthält (Dickinson et al., 1965). Bei einem Serumanteil von 2.5 bzw. 5 % ist dann in Leucin-freiem Medium nur noch 0.5 bzw. 1 % der normalen Leucinkonzentration enthalten. Der Mangel an Leucin hat zumindest in den ersten Stunden nach Con A-Zusatz (s. Tab. 14) bzw. zwischen der 36. und 44. Stunde nach Stimulation keinen Einfluß auf den Thymidineinbau von Lymphozyten

(Richter, 1977). Bei einem Leucingehalt von 22 % der Normalkonzentration kann man Con A-stimulierte Lymphozyten sogar mindestens 30 Stunden kultivieren, ohne daß die Proliferation, gemessen am Thymidineinbau, signifikant beeinträchtigt wird (Tab. 1).

c) Zugabe der radioaktiven Vorstufen

Zur Bestimmung des Thymidin-, Uridin- und Leucin-Einbaus wurden die entsprechenden [ $^3\text{H}$ ] oder [ $^{14}\text{C}$ ]markierten Verbindungen in 0.05 oder 0.1 ml des jeweiligen Mediums (ohne Mitogen, 2-Mercaptoäthanol und Hemmstoff) den Zellsuspensionen in den Kulturröhrchen oder Petrischälchen zugesetzt. Wenn bei der Proteinmarkierung das Leucin-haltige Medium durch Leucin-freies Pulsmedium ersetzt wurde, erhielt das Pulsmedium jedoch die ursprüngliche Konzentration an Mitogen, 2-Mercaptoäthanol und Ovalicin. Die Pulsmedien wurden bei 4°C aufbewahrt und rechtzeitig begast und temperiert (s. Methode 6). Sollten Zellen in größeren Volumina radioaktiv markiert werden, wurden die radioaktiven Vorläufer nach dem Einstellen der spezifischen Radioaktivität mit der entsprechenden unmarkierten Verbindung direkt ohne Medium zugesetzt. Nach Ende des Pulses wurden die Ansätze im Eisbad unter Umschwenken rasch abgekühlt, das säureunlösliche Zellysats gewonnen (s. Methode 8) oder die Zellen vom radioaktiven Medium freigewaschen.

8. Gewinnung des säureunlöslichen Zell- bzw. Kernlysats

a) Bestimmung des Thymidin- und Uridineinbaus

Testansatz in Kulturröhrchen (Lymphozyten und S49.1-Zellen)

α. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Membranfiltern

Wie in Richter (1977) beschrieben.

β. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Glasfaserfiltern  
(in Anlehnung an Ahern et al., 1976)

Alle Lösungen wurden auf 0°C im Eisbad abgekühlt. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt und auf ein mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtetes Glasfaser-

Tab. 1 Stimulation von Lymphozyten durch Con A bei niedrigem Leucingehalt

Lymphozyten wurden wie in Fig. 25 beschrieben stimuliert, jedoch enthielt das Kulturmedium unterschiedliche Leucin-konzentrationen. 30 h nach Mitogenzugabe wurde der [<sup>3</sup>H] Thymidineinbau (1 µCi/ml; spezifische Radioaktivität: 0.5 Ci/mMol) während 1 h bestimmt (Methode 7a, c; 8aβ,10a).

Leucingehalt (52 mg/l = 100 %)	[ <sup>3</sup> H] Thymidineinbau (IpM)
22 %	9411 ± 75
38 %	9106 ± 223
62 %	9193 ± 82
100 %	10187 ± 79

filter gebracht, das in eine Absaugvorrichtung aus Metall eingespannt war. Dabei und auch im Folgenden wurde kontinuierlich abgesaugt. Im Röhrchen verbliebene Zellen wurden mit 2 ml physiologischer Kochsalzlösung auf das Filter überführt, mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit 10 ml 5 % Trichloressigsäure lysiert und mit 10 ml Methanol nachgespült (zur Bestimmung der filtergebundenen Radioaktivität s. Methode 10a).

Testansatz im Petrischälchen (3T6- und HeLa-Zellen)

Das radioaktive Medium wurde nach Ende des Thymidinpulses mit einer Pasteurpipette abgesaugt (Wasserstrahlpumpe, Saugflasche)

und der Zellrasen 2 mal mit 2 ml eiskaltem PBS-Azid (s. Material 3c) gewaschen. Nach möglichst quantitativer Entfernung des Waschpuffers wurden die Zellen bis zur Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufgehoben. Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml 0.3 N NaOH und Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten. Zur Erniedrigung der Viskosität des Zellysats wurden die Proben 2 mal 3 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier: Normalspitze, Stufe 3). 0.5 ml des Homogenates wurden in kleinen Zentrifugengläschen mit 2 ml 10 % Trichloressigsäure ( $0^{\circ}\text{C}$ ) versetzt, eine Stunde auf Eis gestellt und das säureunlösliche Material, wie unter Methode 8b beschrieben, abfiltriert und gewaschen.

b) Bestimmung des Leucineinbaus

( in Anlehnung an Waithe et al., 1971)

α. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Membranfiltern

Wie in Richter (1977) beschrieben.

β. Sammlung des säureunlöslichen Zellysats auf Glasfaserfiltern

Das 'heiße' Medium wurde abzentrifugiert (Christzentrifuge: 10 min, 2000 UpM,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und die Zellen mit 2 ml eiskalter PBS-Azid-Lösung (Material 3c) gewaschen. Nach dem Dekantieren des Waschpuffers (an dieser Stelle konnten die Zellen bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden) wurden 0.2 ml 1 N NaOH zugesetzt und 10 Minuten bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 2 ml eiskalte 10 % Trichloressigsäure (+ 130 mg L-Leucin/l) zugegeben und das Präzipitat 1 Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Danach wurde der Niederschlag aufgewirbelt (Cenko-Mix) und durch ein mit 5% Trichloressigsäure befeuchtetes Glasfaserfilter abgesaugt, Reste des Präzipitats mit 2 ml Trichloressigsäure (+ 130 mg L-Leucin/l) überführt und mit 10 ml Trichloressigsäure/Leucin (s.o.) und 10 ml Methanol gewaschen.

c) Bestimmung des dTTP-Einbaus in Kerne

Die eisgekühlte Probe wurde mit 0.2 ml 0.2 M Natriumpyrophosphatlösung und 1 ml 15 % Trichloressigsäure versetzt und der

Niederschlag durch Zentrifugation gesammelt (Christzentrifuge: 15 min, 3000 UpM, Raumtemperatur). Nach dem Dekantieren wurde der Niederschlag in 0.5 ml 0.3 N NaOH über Nacht bei 37°C gelöst und anschließend durch Zugabe von 3 ml eiskalter 15 % Trichloressigsäure erneut ausgefällt. Der Niederschlag wurde auf einem Glasfaserfilter gesammelt, Reste mit 2 ml 5 % Trichloressigsäure (0°C) auf das Filter gebracht und mit 3 ml 5 % Trichloressigsäure (0°C) gewaschen.

d) Bestimmung des UTP-Einbaus in Kerne

Alle Lösungen waren auf 0°C temperiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Proben auf Eis gestellt, und der Einbau von [<sup>3</sup>H]UTP durch Zugabe von 1 ml Puffer nach Land und Schäfer (1977) (30 mM Tris-HCl, 5 mM Mg-acetat, 120 mM KCl, 7 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 7.5) und 2 ml 10 % Trichloressigsäure gestoppt. Nach 1 Stunde bei 0°C wurde der Niederschlag auf einem Glasfaserfilter gesammelt, das Gläschen mit 2 ml 5 % Trichloressigsäure nachgespült und das Filter 3 mal mit 10 ml Trichloressigsäure (5 %) und einmal mit 10 ml Methanol gewaschen.

Zur Bestimmung der Null-Zeitkontrollen bei den Methoden 8a - 8d wurden Aliquots der Kern- bzw. Zellsuspensionen (0°C) mit eisgekühltem Medium oder Testmischung versetzt und wie die Meßproben aufgearbeitet.

9. Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

a) Zur Analyse von Proteinen

α. Probenvorbereitung

Alle Manipulationen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 0 - 4°C durchgeführt.

Lysat ganzer Zellen

Die [<sup>14</sup>C]Leucin-markierten Zellen wurden mit einer Pasteurpipette in spitze Zentrifugengläser überführt, die Röhrchen mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung nachgespült und zentrifugiert (Christzentrifuge: 10 min, 2000 UpM). Nach vollständigem Dekantieren wurde das Pellet mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die nach dem Dekantieren

verbleibende Flüssigkeitsreste wurden mit Haushaltspapier entfernt und die Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Lyse wurden die Proben mit 40  $\mu\text{l}$  Mercaptoäthanol haltigem Probenpuffer (s. Material 3d) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz einer Mikrospatelspitze Saccharose wurden 20  $\mu\text{l}$  je Gellaufstrecke aufgetragen. Dies entsprach ungefähr den Lyseprodukten von  $1 \times 10^6$  bei Kulturbeginn in die Flaschen eingesäten Lymphozyten.

#### Kernlysate

Nach dem Auftauen im Eisbad wurden die Kerne (Isolierung s. Methode 13a $\beta$ ) mit Probenpuffer (s. Material 3d) versetzt und die Lyse durch 3 - 10 minutiges Erhitzen auf  $100^{\circ}\text{C}$  vervollständigt. Es wurden pro Laufstrecke die Lyseprodukte von ca.  $3 \times 10^6$  Lymphozyten (bezogen auf die zu Versuchsbeginn eingesetzte Zellmenge) in 20  $\mu\text{l}$  aufgetragen.

#### Kernlysateüberstand

Der Kernlysateüberstand (Isolierung s. Methode 13a $\beta$ ) wurde aufgetaut und nach Bendsadoun und Weinstein (1976) das Protein ausgefällt. Dazu wurde zu 1 ml der verdünnten Proteinlösung 0.2 ml Wasser und 10  $\mu\text{l}$  2 % Natriumdesoxycholat pipettiert. Nach 15 Minuten bei  $0^{\circ}\text{C}$  wurden 0.5 ml 24 % Trichloressigsäure zugesetzt und der Niederschlag abzentrifugiert (Labofuge: 30 min, 4000 UpM, Raumtemperatur). Der Niederschlag wurde nach Neutralisierung der verbliebenen Trichloressigsäure mit 5  $\mu\text{l}$  1 N NaOH in 50  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (s. Material 3d) gelöst und pro Laufstrecke die Lyseprodukte von ca.  $4 \times 10^6$  Lymphozyten in 20  $\mu\text{l}$  aufgetragen.

#### $\beta$ -Herstellung der Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengele

Die Natriumdodecylsulfat-Gele in Anlehnung an Laemmli (1970) wurden in einer Apparatur und nach Angaben der Fa. Hölzel (Dorfen, Obb.) durchgeführt. Es wurden Gele mit konstantem Acrylamidgehalt (10 %: s. Fig. 30) und mit linearem Acrylamidkonzentrationsgradienten (5 - 15 %: s. Fig. 32) verwendet.

Zusammensetzung der Gele:

1) Gele mit konstanter Acrylamidkonzentration

Trenngel: 0.375 M Tris-HCl pH 8.8  
0.1 % Natriumdodecylsulfat  
10 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbis-  
acrylamid = 30 : 0.8)  
0.03 %  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$   
0.05 % (v/v) TEMED

Sammelgel: 0.124 M Tris-HCl pH 6.8  
0.1 % Natriumdodecylsulfat  
3 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbis-  
acrylamid = 30 : 0.8)  
0.06 %  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$   
0.05 % (v/v) TEMED

2) Gele mit linearem Acrylamidkonzentrationsgradienten

Trenngel: Wie unter 1) beschrieben, jedoch mit 5 - 15 %  
Acrylamid, 0.045 - 0.015 %  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 0.075 - 0.025 TEMED

Sammelgel: s. 1)

$\gamma$ . Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Gel mit konstanter Acrylamidkonzentration für 1.5 Stunden bei 150 V (19 mA) und 3.5 Stunden bei 250 V (25 mA) bei 4°C, im Gradientengel für 16 Stunden bei 60 V und Raumtemperatur.

b) Zur Analyse von RNA

Die Analyse von RNA wurde in Anlehnung an Loening (1967), Peacock und Dingman (1968) und Shaaya (1976) durchgeführt.

$\alpha$ . Probenvorbereitung

Das RNA-Pellet von ursprünglich  $50 \times 10^6$  eingesäten Zellen wurde bei 0°C in 0.1 ml Elektrophoresepuffer (Shaaya (1976): 36 mM Tris, 34 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM Na-Äthylendiamin-tetraessigsäure, 0.2 % Na-Dodecylsulfat) gelöst und bei - 20°C aufbewahrt. Für die Elektrophorese wurden 50  $\mu\text{l}$  (Fig. 42) bzw. 80  $\mu\text{l}$  (Fig. 43) der aufgetauten RNA-Lösung in einem Eppendorfgefäß mit 10 % Saccharose (RNasefrei, Merck, Darmstadt) und einigen

Kristallen Bromphenolblau versetzt, 2-4 Minuten bei 100°C inkubiert, rasch auf 0°C abgekühlt und mit einer Hamilton-spritze unterschichtend auf Polyacrylamid-Rundgelen aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 0.1 - 0.2 ml einer gleichbehandelten Lösung von 23 S und 16 S rRNA aus E. coli und 4 S RNA aus Bierhefe (beide Boehringer, Mannheim) in Elektrophoresepuffer (je 0.33 mg/ml) auf Parallelgele aufgesetzt.

#### β. Herstellung der Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgele

Die Gele für die Auftrennung der RNA-Spezies nach dem Molekulargewicht wurden in Anlehnung an Peacock und Dingman (1968) hergestellt.

Zusammensetzung der Gele: 36 mM Tris

34 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 mM Na-Äthylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)

0.2 % (w/v) Na-Dodecylsulfat

2.2 % Acrylamid (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 20 : 1 (Fig. 42d) bzw. 48 : 1 (Fig. 42c, 43)

0.5 % Agarose

0.4 % (v/v) Dimethylaminopropionitril

0.05 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

Die Agarose diente zur mechanischen Stabilisierung der Gele mit niedrigem Acrylamidgehalt (vgl. Peacock und Dingman, 1968). Zur Herstellung der Gele wurde 0.1 g Agarose in 8 ml 2 x konzentriertem Elektrophoresepuffer (s. Methode 9b) durch 15 minutiges Erhitzen auf 100°C gelöst, die Lösung auf 45°C abgekühlt und mit 5.25 ml der auf 45°C erwärmten Lösung A (4 ml 2 x konzentrierter Elektrophoresepuffer (s. Methode 9b), 4 ml Acrylamidlösung ('48 : 1' = 21.55 g Acrylamid, 0.45 g N,N'-Methylenbisacrylamid; '20 : 1' = 20.9 g Acrylamid, 1.1 g N,N'-Methylenbisacrylamid ad 100 ml Wasser), 2.5 ml 6.4 % Dimethylaminopropionitril) vermischt. Nach Zusatz von 0.625 ml

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (16mg/ml) wurde die Lösung rasch mit einer temperierten Pipette in 14 cm lange Glasröhrchen (Durchmesser 0.5 cm) gefüllt, die mit einer Dialysemembran und Gummiring am unteren Ende verschlossen waren und in einem Reagensglas mit 1 ml Elektrodenpuffer (s. Methode 9b) standen. Anschließend wurde das noch flüssige Gel vorsichtig mit Wasser überschichtet, Nach Erstarren und Polymerisation des Gels wurde das obere Ende für den Probenauftrag mit einer Rasierklinge glatt abgeschnitten.

#### $\gamma$ . Auftrennen der RNA-Spezies

Vor Auftrennung der RNA wurden die Gele zur Entfernung von überschüssigem Ammoniumperoxodisulfat ca. 0.5 Stunden bei 50 V vorelektrophoretisiert. Die RNA wurde dann durch Elektrophorese im Kühlraum (4°C) bei 35 V (0.5 h) und anschließend bei 65 V/5 mA pro Röhrchen (4.5 h) getrennt. Der ursprünglich auf Raumtemperatur gebrachte Elektrophoresepuffer (s. Methode 9b) kühlte sich bis zum Ende der Trennung auf 7 - 8°C ab, ohne daß Na-Dodecylsulfat auskristallisierte. Elektrophoresepuffer und Gele enthielten 3 mg/l Ethidiumbromid, um die Marker RNA im UV-Licht sichtbar machen zu können. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Gele mit den RNA-Markern mehrere Stunden in Wasser (4°C) entfärbt und die Wanderungsstrecken relativ zur Bromphenolblaufront unter dem UV-Licht bestimmt. Diese so ermittelten  $R_f$ -Werte wurden gegen den Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen (Fig. 1). Mit Hilfe der so erhaltenen Eichgeraden konnten nach Umrechnung der Molekulargewichte nach einer Formel von Spirin (1963): Molekulargewicht =  $1550 \times S^{2.1}$  den radioaktiv markierten RNA-Spezies angenäherte S-Werte zugeordnet werden (s. Tab. 18).

## 10. Scintillationsmessung

### a) Filtergebundene Radioaktivität

Die mit radioaktiv markiertem Material beladenen Filter (Beladung s. Methode 8) wurden auf den Boden von Zählgläschen gelegt, 1 Stunde unter Rotlicht getrocknet, mit 10 ml Toluol-

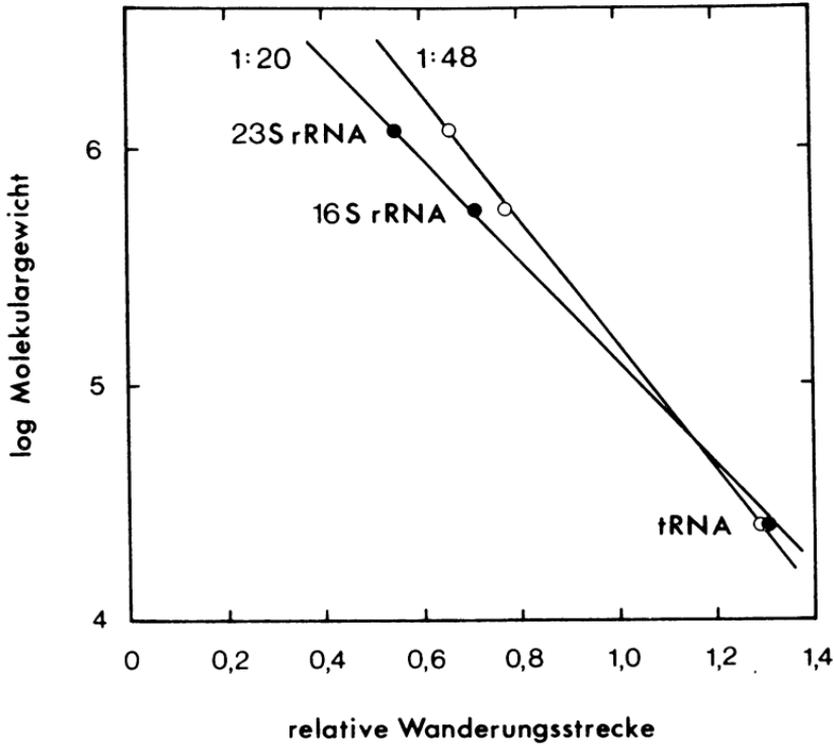


Fig. 1 Eichkurve für die Molekulargewichtsbestimmung von RNA in Polyacrylamidgelen

16, 23 S rRNA (*E. coli*) und 4 S RNA (Bierhefe) wurden in Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgelen mit einem Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid-Verhältnis von 1 : 20 (●) bzw. 1 : 48 (○) elektrophoretisch aufgetrennt (Methode 9b). Die Wanderungsstrecken wurden relativ zur Bromphenolblaubande angegeben.

Molekulargewichte (nach Lehrach et al., 1977):

$$\begin{aligned} 23 \text{ S} &= 1.2 \times 10^6 \\ 16 \text{ S} &= 5.5 \times 10^5 \\ 4 \text{ S} &= 2.5 \times 10^4 \end{aligned}$$

Zählflüssigkeit (4 g 2,5-Diphenyloxazol und 1,4-Bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol (50 mg)/l Toluol) bedeckt und ihre Radioaktivität durch 10 minutiges Zählen im Scintillations-

zähler (Isocap 300, Searle, Nuclear Chicago; Mark II, Searle, Nuclear Chicago) bestimmt.

Um folgende Null-Zeit-Kontrollwerte (Bestimmung s. Methode 8d) wurden die Meßwerte korrigiert:

[<sup>3</sup>H]Thymidin: 800 IpM (Membranfilter; 1 µCi/ml; 6.7 Ci/mMol)  
 57 IpM (Glasfaserfilter; 1 µCi/ml, 0.5 Ci/mMol)

[<sup>3</sup>H]Uridin: 53 IpM (Glasfaserfilter; 1 µCi/ml, 0.2 -  
 2.0 Ci/mMol)

[<sup>3</sup>H]Leucin: 160 IpM (Membranfilter; 5 µCi/ml)  
 120 IpM (Glasfaserfilter; 5 µCi/ml)

Tab. 2 Alkalilabilität des [<sup>3</sup>H]Uridin-inkorporierenden Zellsats stimulierter Lymphozyten

Glasfaserfilter mit [<sup>3</sup>H]Uridin markiertem Material (das Material stammte aus dem in Fig. 38 dargestellten Versuch) wurden nach Bestimmung der Radioaktivität im Scintillationszähler getrocknet und in frischen Scintillationsgläschen mit 0.5 ml 0.5 N NaOH für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme des Filters wurden 0.125 mg DNA zugesetzt, die am Filter haftende Flüssigkeit mit 2 ml 10 % Trichloressigsäure in das Scintillationsgläschen gespült und die Inkubationsflüssigkeit erneut durch das Filter gesaugt. Das Filter wurde mit jeweils 10 ml 10 % Trichloressigsäure und Methanol nachgewaschen und die filtergebundene Radioaktivität bestimmt (Methode 10a).

Zellsat	filtergebundene Radioaktivität (IpM)	
	vor NaOH- Behandlung	nach NaOH- Behandlung
ungehemmter Lymphozyten	55 976 ± 1715	1 053 ± 207
Ovalicin <sub>7</sub> (2 x 10 <sup>-7</sup> M) gehemmter Lymphozyten	45 531 ± 89	458 ± 58

Das [ $^3\text{H}$ ]Uridin markierte, säureunlösliche Zellysate ungehemmter und Ovalicin gehemmter Zellen war zu über 98 % alkalilabil und somit zum größten Teil RNA (Tab. 2).

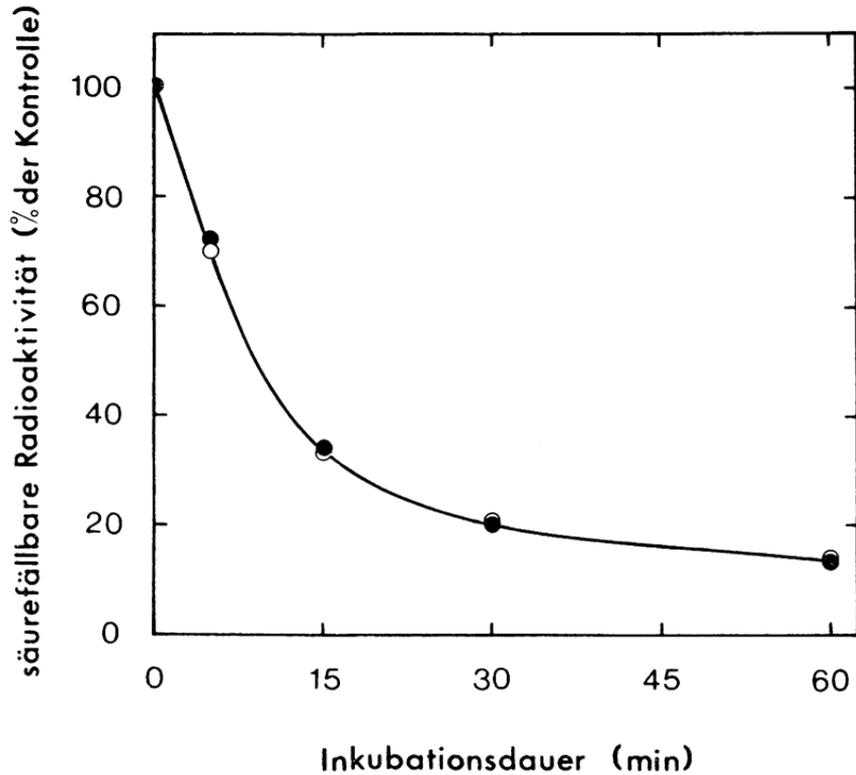


Fig. 2 DNase-Behandlung von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin-markiertem Chromatin  
Con A-stimulierter Lymphozyten

Lymphozyten mit und ohne Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M) wurden wie in Fig. 40 beschrieben mit Con A stimuliert und 30 h nach Mitogenzugabe mit  $15 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]Thymidin (1 h;  $1 \mu\text{Ci/ml}$ ,  $0.5 \text{ Ci/mMol}$ ) markiert (Methode 7c). Das Chromatin wurde isoliert (Methode 13b), unterschiedlich lang mit DNase behandelt (Methode 20) und die verbleibende säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (Methode 20).

○ - Ovalicin  
● - + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

Zur Analyse des [ $^3\text{H}$ ]Thymidin-inkorporierenden Materials wurde aus markierten ungehemmten und Ovalicin gehemmten Lymphozyten Chromatin isoliert (Methode 13b), beschallt und mit pankreatischer DNase I (Boehringer Mannheim) behandelt (Methode 20). In beiden Fällen wurden mindestens 85 % der Radioaktivität säurelöslich (Fig. 2) und somit ursprünglich definitionsgemäß in DNA eingebaut.

b) Bestimmung der Radioaktivität in Polyacrylamidgelen

Zur Bestimmung der Radioaktivität in Polyacrylamid-Plattengelen wurde die Laufstrecke (1 x 8 cm) ausgestanzt und mit einem automatischen Gelschneider (Feinmechanische Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München) in 1 mm breite Stücke zerschnitten (unter der freundlichen Mithilfe von Richard Zimmermann, Institut für Physiologische Chemie, München). Rundgele wurden ebenfalls mit einem Gelschneider (Feinmechanische Werkstatt, Institut für Biochemie, München) in 1 mm breite Scheibchen zerschnitten. Die Gelstücke wurden mit einem Mikrospatel in Zählgläschen überführt, mit 0.25 bzw. 0.5 ml Soluene 350 (Packard Instrument Comp., Warrenville, USA) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Zur Vervollständigung des Quellvorgangs wurden die Proben noch 0.5 - 2 Stunden bei 50°C gehalten, nach dem Abkühlen mit 8 ml Toluolzählflüssigkeit (s. Methode 10a) versetzt und nach mehrstündigem Äquilibrieren im Dunkeln (4°C) zum Abklingen der Lumineszens für 10 Minuten im Scintillationszähler gezählt.

Die bei Doppelmarkierungsexperimenten nötige Korrektur der gemessenen Impulse um die im selben Kanal miterfaßten Impulse des jeweils anderen Isotops wurde mit einem HP 95-Rechner (Hewlett Packard, Cupertino, USA) nach folgender Formel durchgeführt:

$$A_w = \frac{(I_A - O_A) - a(I_B - O_B)}{1 - ab} \quad \text{mit } a = \frac{B_A - O_A}{B_B - O_B}$$

$$B_w = \frac{(I_B - O_B) - b(I_A - O_A)}{1 - ab} \quad \text{mit } b = \frac{A_B - O_B}{A_A - O_A}$$

Dabei bedeuten

- $I_A$  im Kanal A gemessene Probe (IpM)
- $I_B$  im Kanal B gemessene Probe (IpM)
- $A_A$  im Kanal A gemessene Standardprobe mit Isotop A (IpM)
- $A_B$  im Kanal B gemessene Standardprobe mit Isotop A (IpM)
- $B_B$  im Kanal B gemessene Standardprobe mit Isotop B (IpM)
- $B_A$  im Kanal A gemessene Standardprobe mit Isotop B (IpM)
- $O_A$  Leerwert Kanal A
- $O_B$  Leerwert Kanal B
- a Anteil der im Kanal A mitgezählten IpM des Isotops B
- b Anteil der im Kanal B mitgezählten IpM des Isotops A

Gleichbehandelte Gelstücke mit oder ohne zugesetzter [ $^3\text{H}$ ] bzw. [ $^{14}\text{C}$ ] Radioaktivität dienten als Standardproben. Rund 20 % der [ $^{14}\text{C}$ ] Impulse wurden bei den [ $^3\text{H}$ ] Impulsen mitgezählt. Der Anteil der im [ $^{14}\text{C}$ ] Kanal miterfaßten [ $^3\text{H}$ ] Impulse war kleiner als 1 %.

c) Bestimmung [ $^{14}\text{C}$ ] markierter Lipide

α. Gesamtlipid

Ein Aliquot der benzolischen Lipidlösungen (20 - 100  $\mu\text{l}$ ) wurde direkt zu 9 ml Toluolzählflüssigkeit (s. Methode 10a) gegeben und im Scintillationszähler 10 Minuten gezählt. Der Leerwert wurde nach Zugabe der gleichen Menge reinen Benzols zu 23 IpM bestimmt und zur Berechnung des Gesamtlipids von den Meßwerten abgezogen.

β. Lecithinfraktion

Die aus der Kieselgelplatte ausgekratzte Lecithinfraktion (s. Methode 12b) wurde mit 9 ml Toluolzählflüssigkeit versetzt, umgeschwenkt und im Scintillationszähler 10 Minuten gezählt. Der Leerwert wurde durch Zugabe einer gleichen Menge

Kieselgel ohne Radioaktivität zu 26 IpM bestimmt und von den Meßwerten abgezogen.

## 11. Autoradiographie

### a) Gele

Die Gele wurden, wie in Richter(1977) beschrieben, getrocknet und autoradiographiert.

### b) Autoradiographie [<sup>14</sup>C]Thymidin-markierter Lymphozyten (in Anlehnung an Hünig (1973) und Hünig et al. (1974))

#### α. Präparation der Zellen

Alle Manipulation erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, bei 0 - 4°C.

Die mit [<sup>14</sup>C]Thymidin markierte Lymphozytensuspension (Markierungsbedingungen s. Tab. 5) wurde in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt, die Kulturröhrchen mit BSS, das 0.1 mg/ml Thymidin enthielt (= BSS/Thymidin) nachgespült, mit BSS/Thymidin auf 25 ml aufgefüllt und zentrifugiert (Christzentrifuge: 7 min, 1600 UpM). Der Überstand wurde möglichst quantitativ dekantiert und das Zellpellet noch 2 mal mit 10 ml BSS/Thymidin gewaschen (Zentrifugation s.o.) und schließlich in 4 ml BSS/Thymidin suspendiert. Zum Einbetten der Zellen in Agarose wurden die Zellaggregate durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pasteurpipette zerstört. 0.25 ml dieser auf Raumtemperatur erwärmten Zellsuspension wurden mit 0.5 ml einer auf 45°C temperierten 0.5 % Agaroselösung (in BSS durch Erwärmen auf 100°C gelöst) gemischt, sofort mit einer Pasteurpipette auf einen Objektträger gebracht und unter Aussparung des Mattschilds gleichmäßig verteilt. Zur besseren Haftung der Agaroselösung war der Objektträger zuvor mit 0.1 % wässriger Agarose bestrichen und luftgetrocknet worden. Nach Erstarren der Agarose wurden die Proben in frisch angesetzter 0.5 % Glutardialdehyd-Lösung (in PBS; s. Material 3c) 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, 3 mal je 10 Minuten in deionisiertem Wasser gewässert und an einem staubarmen Ort getrocknet.

### β. Autoradiographie

Die Autoradiographie wurde, wie in Hünig (1973) beschrieben, durchgeführt.

### γ. Giemsa-Färbung der Zellen

Die entwickelten, luftgetrockneten Autoradiogramme wurden nach folgendem Schema in Färbetrögen gewaschen und gefärbt. Die Einwirkungsdauer pro Stufe betrug jeweils 3 Minuten; gefärbt wurde 10 - 15 Minuten.

- 1) 50 % Äthanol in Gebrauchspuffer (1.65 g Zitronensäure, 4.12 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 5.75)
- 2) 95 % Äthanol
- 3) Gebrauchspuffer
- 1) - 3) wiederholen
- 4) Gebrauchspuffer
- 5) Färbelösung (230 ml Gebrauchspuffer, 7.5 ml Methanol, 12.5 ml Giemsa-Färbelösung (Merck, Darmstadt); jeweils frisch angesetzt und filtriert)
- 6) Gebrauchspuffer
- 7) Gebrauchspuffer
- 8) destilliertes Wasser

Die Objektträger wurden luftgetrocknet und mit Entelan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

### δ. Auswertung

Die Autoradiogramme wurden, wie in Hünig (1973) beschrieben, ausgewertet. Durch geeignete Wahl der Expositionszeit wurde erreicht, daß eine für das zuverlässige Auszählen kritische Anzahl von Silberkörnern pro Zelle (ca. 300) nicht überschritten wurde. Zur Bestimmung des Anteils markierter Zellen wurden mindestens 500 Zellen ausgewertet. Zellen mit mehr als 5 Silberkörnern in der nächsten Umgebung galten als markiert. Die Markierungstärke (Zahl der Silberkörner/Zelle) wurde durch Auszählen von mindestens 60 Zellen bestimmt. Wurden Zellen oder Zellgruppen mehrmals ausgezählt, so lagen die Werte innerhalb  $\pm 5$  %. Schwierigkeiten ergaben sich bei Zellaggregationen, da die Silberkörner nicht mehr eindeutig einer bestimm-

ten Zelle zugerechnet werden konnten. Es wurde trotzdem versucht, alle im Gesichtsfeld auftauchenden Zellen auszuwerten.

## 12. Extraktion und Analyse von Lipiden

### a) Extraktion

Die eisgekühlten, mit [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat markierten Lymphozytensuspensionen (Einzelheiten der Markierung s. Tab. 7) wurden in 50 ml Plastikröhrchen gegossen, die Kulturflaschen mit 10 ml eiskaltem BSS (s. Material 3a) nachgespült und mit BSS ( $0^{\circ}\text{C}$ ) auf 50 ml aufgefüllt. Nach der Zentrifugation (Christzentrifuge: 10 min, 1600 UpM,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde das radioaktive Medium gründlich dekantiert, das Zellpellet in 0.5 ml BSS ( $0^{\circ}\text{C}$ ) suspendiert und in einen 25 ml Erlenmayerkolben überführt. Der Rest der Zellen wurde mit weiteren 0.5 ml BSS aus dem Röhrchen gespült und mit der Hauptmenge vereinigt. Die Lipide wurden, wie von Ways und Hanahan (1964) beschrieben, isoliert. Anschließend wurde die Radioaktivität eines Aliquots, wie in Methode 10c beschrieben, bestimmt und über das Gesamtvolumen, das durch Auswägen ermittelt wurde, die Gesamtmenge an radioaktiv markiertem Lipid errechnet.

### b) Gewinnung der Lecithinfraktion

Die Lipide wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Polygram Sil G auf Kunststoffolie, 0.25 mm, Macherey und Nagel, Düren) mit Chloroform-Methanol-Wasser (65 : 40 : 9.5, v/v/v) getrennt (unveröffentlichte Ergebnisse von Murder et al. zitiert in Resch und Ferber, 1972). Als interner Marker wurden 0.2 mg Lecithin bei jeder Probe mit aufgetragen. Die Lipide wurden durch Joddampf sichtbar gemacht, die Lecithinfraktion mit einem Spatel ausgekratzt und ihre Radioaktivität bestimmt (Methode 10c $\beta$ ).

## 13. Isolierung von Kernen, Kernüberstand und Chromatin aus Lymphozyten (in Anlehnung an Benz und Strominger, 1975)

### a) Isolierung von Lymphozytenkernen

$\alpha$ . Für die Bestimmung der DNA- und RNA-Synthese in isolierten Kernen

Zu den in den Legenden angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet, aufgewirbelt und in 50 ml Plastikröhrchen bei Raumtemperatur zentrifugiert (Labofuge II, Haereus-Christ: 5 - 10 min, 1700 UpM = 500 x g). Die Zellen wurden in 10 ml P1 (Raumtemperatur; 0.15 M Saccharose, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES = N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure, pH 8.0) gründlich durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer Pasteurpipette suspendiert und die Zellzahl in einer Zählkammer (Helber) bestimmt. Die Zellausbeute betrug im Durchschnitt für Kulturen mit und ohne Ovalicin rund 45 Stunden nach Mitogenzugabe 42 bzw. 44 % bezogen auf die zu Versuchsbeginn eingesäten Zellen. Nach Zentrifugation (s.o.) und Dekantieren des Waschpuffers wurden die Zellen im Eisbad vorsichtig mit einem Glasstab in 0.5 - 1.0 ml eiskaltem P2 (0.25 M Saccharose, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES, pH 8.0) suspendiert (resultierende Zelldichte: 1 - 4 x 10<sup>8</sup> ursprünglich eingesäte Zellen/ml) und mit dem gleichen Volumen eiskalten P3 (= P1 mit 0.5 % Brij 58, Serva, Heidelberg) verdünnt. Die Zellen wurden 5 Minuten vorsichtig mit einem Glasstab bei 0°C gerührt, anschließend 25 - 50 fach mit eiskaltem P4 (= P2 mit 2 % Dextran MW 100 000 - 200 000, Clinical Grade, Sigma, Taufkirchen) verdünnt und zentrifugiert (Christzentrifuge: 5 min, 1700 UpM = 500 x g, 4°C). Gegebenfalls wurden die Zellen mit weiteren 2 ml P4 gewaschen (Fig. 27). Nach dem Abgießen des Waschpuffers wurde die am Röhrchen verbleibende Flüssigkeit mit Haushaltspapier abgewischt und das farblose Pellet in 0.5 - 1.0 ml P4 (0°C) bzw. in Inkubationspuffer (Material 3i) vorsichtig resuspendiert (resultierende Kernkonzentration: 10 - 20 x 10<sup>6</sup> Kerne/ml) und die Kernzahl bestimmt (s.o.). Die Ausbeute lag bei ca. 20 % bezogen auf die Anzahl wiedergefundener Zellen. Die Kerne wurden sofort verwendet. Die Puffer P1 - P4 wurden bei - 20°C aufbewahrt und rechtzeitig vor Gebrauch aufgetaut und temperiert.

β. Für die Analyse radioaktiv markierter Kernproteine

Die Isolierung der Kerne erfolgte wie in Methode 13aα beschrieben, jedoch mit folgenden Änderungen:

Alle Manipulationen wurden bei 0 - 4°C durchgeführt. Die mit [<sup>3</sup>H] bzw. [<sup>14</sup>C]Leucin markierten Zellen (Methode 7c) mit und ohne Ovalicin wurden nach Pulsende vereinigt, mit P1 auf 40 ml aufgefüllt, zentrifugiert (s. Methode 13aα), mit 20 ml P1 gewaschen und wie oben lysiert. Nach der Zentrifugation wurden Kernpellet und Kernüberstand getrennt in flüssigen N<sub>2</sub> eingefroren und bei - 20°C aufbewahrt. Zur Analyse der Proteine s. Methode 9.

b) Isolierung von radioaktiv markiertem Chromatin aus Lymphozyten

Die ersten Schritte der Chromatinisolierung wurden wie in Methode 13aβ beschrieben durchgeführt. Nach Zellyse wurde jedoch mit 40 ml Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer (0.5 M Tris-HCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) verdünnt, das gebildete fädige Chromatin mit einer Pasteurpipette in kleine Corexgläser überführt und zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge: 5 min, 10 000 x g, 4°C). Das Pellet wurde mit 10 ml Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer gewaschen und in 1.1 ml Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier: Mikrospritze, Stufe 4, 3 x 5 Sekunden, 0°C) suspendiert.

c) Ultraschallbehandlung der Kerne

(in Anlehnung an Thompson und Mueller, 1975)

0.8 ml Kernsuspension (s. Methode 13aα) wurden 4 x 10 Sekunden in einem spitzen Zentrifugenglas bei 0°C beschallt (Branson Sonifier: Mikrospritze, Stufe 3).

14. Messung der DNA-Synthese in isolierten Lymphozytenkernen

(nach Benz und Strominger, 1975)

a) Testansatz

Folgende Inkorporationsmischung wurde vor jedem Experiment frisch zusammenpipettiert (Herstellung und Lagerung der Stammlösungen s. Material 3f):

- je 0.5 mM dATP, dGTP, dCTP
- 0.2 mM [ $^3\text{H}$ ]dTTP (100 Ci/Mol)
- 5.0 mM ATP
- 12.5 mM Phosphoenolpyruvat
- 5 Einheiten/ml Pyruvatkinase
- 38 mM HEPES-Puffer pH 8.0
- 0.125 M Saccharose
- 0.1 M NaCl
- 12.5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 12.5 mM Äthylenglycol-bis( $\beta$ -aminoäthyläther)-N,N'-tetra-  
essigsäure (EGTA)
- 2 mM Dithiothreitol

0.1 ml dieser Mischung wurden in kleine Reagensgläser pipet-  
tiert, mit 0.15 ml Kernsuspension (s. Methode 13a $\alpha$ ) gemischt  
und die Reagensgläser mit Parafilm verschlossen. Zum Start der  
Reaktion wurden die Proben aus dem Eisbad in ein auf 37°C tem-  
periertes Wasserbad gebracht und wenn nicht anders angegeben  
45 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt  
und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode  
8c).

#### b) Charakterisierung des zellfreien Systems

Die strenge ATP-Abhängigkeit dieses DNA-Polymerasesystems  
(Tab. 3), die bereits von Benz und Strominger (1975) berich-  
tet wurde, ist ein Hinweis darauf, daß [ $^3\text{H}$ ]dTTP hauptsächlich  
durch DNA-Replikation und nicht durch DNA-Reparatur eingebaut  
wurde (Benz und Strominger, 1975).

Der [ $^3\text{H}$ ]dTTP-Einbau in säureunlösliches Kernmaterial nahm li-  
near mit der pro Test eingesetzten Kernmenge (bis mindestens  
 $2.3 \times 10^6$  Kerne/Test) zu. Bei Kernzahlen kleiner als  $1.5 \times 10^6$   
Kerne/Test lagen die Einbauwerte tiefer als erwartet (Fig. 3),  
sodaß, um die DNA-Polymeraseaktivität verschiedener Kernprä-  
parationen vergleichen zu können, die Meßwerte nach folgender  
Formel korrigiert werden mußten:

$$\text{IpM}/10^6 \text{ Kerne} = \frac{(\text{IpM} - 57^+)}{\text{Kernzahl/Test}} \times f \times 10^6 + 57^+$$

f = erwartete IpM/gefundene IpM;  $^+$ ) Nullzeit-Kontrolle

Tab. 3 ATP-Abhängigkeit des [<sup>3</sup>H]dTTP-Einbaus isolierter Lymphozytenkerne

50 x 10<sup>6</sup> nicht vorinkubierte Zellen (1 x 10<sup>6</sup>/ml) wurden durch Zugabe von Con A (Endkonzentration: 2 µg/ml) und 2-Mercapto-äthanol (Endkonzentration: 2.5 x 10<sup>-5</sup> M) in Kulturmedium mit 5 % fötalem Kälberserum stimuliert (Methode 4aß), nach 45 h die Kerne isoliert (Methode 13aa; der P4-Puffer enthielt jedoch 0.285 M statt 0.25 M Saccharose und zusätzlich 1 mM Dithiothreitol) und der [<sup>3</sup>H]dTTP-Einbau innerhalb von 45 min bei 37°C gemessen (s. Methode 8c, 14a).

ATP + ATP regenerierendes System	[ <sup>3</sup> H]dTTP-Einbau in Kerne (IpM x 10 <sup>-6</sup> x Kerne <sup>-1</sup> )
+	2618 (100 %)
-	358 (14 %)

15. Proteinsynthese an isolierten Lymphozytenribosomen

Rattenleberüberstand und Lösungen wurden freundlicherweise von H. Richter zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung von Überstandsfaktoren aus Rattenleber, die Isolierung von Ribosomen aus stimulierten Lymphozyten und die zellfreie Proteinsynthese wurden in Anlehnung an Ahern und Kay (1973) wie in Richter (1977) beschrieben, durchgeführt.

Zur Charakterisierung des zellfreien Proteinsynthese-Systems (Poly rU gesteuerte Polyphenylalaninsynthese) wurde die Einbaukinetik von Phenylalanin in säureunlösliches Material (Fig. 4a) und die Abhängigkeit des Einbaus von der Ribosomenmenge (Fig. 4b) bestimmt. Als Maß für die Ribosomenmenge diente ihr RNA-Gehalt. Der RNA-Gehalt der verwendeten Ribosomen wurde spektralphotometrisch wie bei Richter (1977) beschrieben, bestimmt und nach Warburg und Christian (1941) ausgewertet.

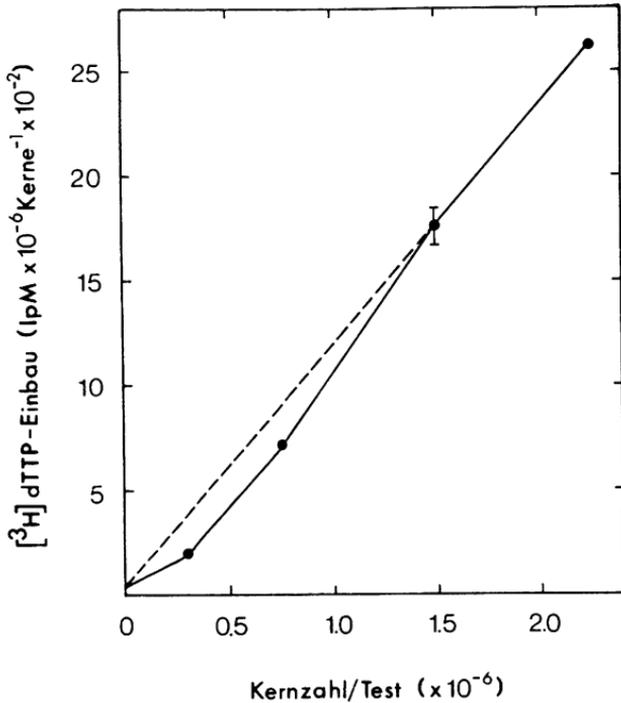


Fig. 3 Abhängigkeit des [<sup>3</sup>H]dTTP-Einbaus von der Kernzahl

Durchführung des Experiments wie in der Legende von Tab. 8 beschrieben, jedoch erhielten die Zellen 2-Mercaptoäthanol bereits mit dem Mitogen (t = 0). Im Kerntest wurde die in der Abszisse angegebene Anzahl von Kernen eingesetzt.

Zellernte: t = 47 h

16. Mikroskopische Bestimmung des Durchmessers von Lymphozyten

a) Zellpräparation

Zur Bestimmung des Durchmessers von Lymphozyten wurden entweder die für die Autoradiographie präparierten Zellen verwendet (S. Methode 11b; Fig. 14, 20) oder die Zellen mit folgenden Änderungen fixiert:

Zu den in Fig. 33 angegebenen Zeiten wurden die Zellen aufgewirbelt, je Flasche 0.5 ml Zellsuspension entnommen und in

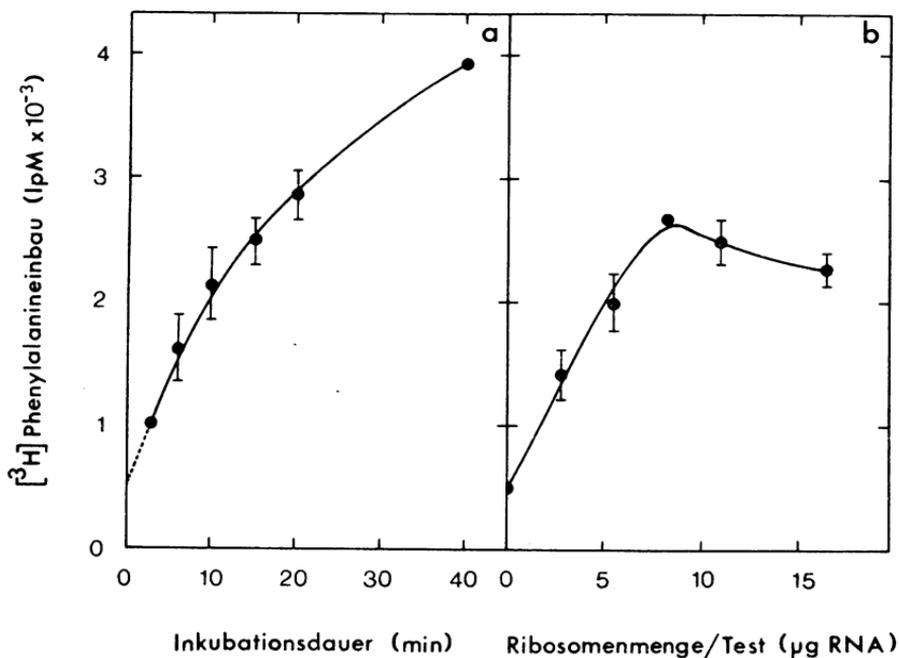


Fig. 4 Poly rU-gesteuerte Polyphenylalaninsynthese an Lymphozytenribosomen - Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Ribosomenmenge

$130 \times 10^6$  nicht vorinkubierte Zellen ( $2.6 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden mit Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration:  $10^{-2}\text{M}$ ) versetzt, 40 h nach Mitogenzugabe Ribosomen isoliert (s. Methode 15) und ihre Aktivität an Poly rU bei  $37^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit von Zeit und Ribosomenmenge bestimmt (s. Methode 15).

a) Zeitabhängigkeit des Phenylalanineinbaus

Die pro Test eingesetzten Ribosomen enthielten  $10.8 \mu\text{g RNA}$

b) Abhängigkeit des Phenylalanineinbaus von der Ribosomenmenge

Inkubationsdauer: 15 min

eisgekühlte kleine Rörchen gegeben. Die Suspension wurde mit 2.5 ml PBS-Puffer (s. Material 3c) versetzt und zentrifugiert (Christzentrifuge: 10 min,  $1600 \text{UpM}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Zellpellet wur-

de anschließend in 0.5 ml eiskaltem PBS durch 3 maliges Aufsaugen mit einer Pasteurpipette gründlich suspendiert und wie in Methode 11b eingebettet und gefärbt. Es wurde jedoch PBS-Puffer anstatt BSS/Thymidin verwendet.

b) Auswertung

Der Durchmesser der Zellen wurde bei einer Vergrößerung von 1 : 1250 (Ortholux, Leitz, Wetzlar; NPL Fluotar 100/1.32 Öl-immersionsobjektiv, Okular 1 : 12.5, Grünfilter) mit Hilfe eines Zählnetzes (1 x 1 cm in 100 Quadrate mit 1 mm Seitenlänge geteilt; 1 mm = 10  $\mu$ m) durch 2 zueinander senkrechte Messungen bestimmt. Es wurde versucht auf 0.5  $\mu$ m genau zu interpolieren. Die Durchmesser stimulierter Lymphozyten lagen zwischen 2 - 15  $\mu$ m. Zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung der Durchmesser wurden je 3 Größenklassen zu einer Gruppe zusammengefaßt. Aus den Größenklassen 2; 2.5; 3, 3.5; 4; 4.5, 5; 5.5; 6, 6.5; 7; 7.5, 8; 8.5; 9, 9.5; 10; 10.5, 11; 11.5; 12 und 12.5; 13; 13.5  $\mu$ m wurde dazu jeweils das arithmetische Mittel gebildet und gegen die Häufigkeit aufgetragen. Pro Probe wurden 250 Zellen mit deutlich sichtbarem Kern ausgemessen. Die absolute Zellzahl wurde dabei nicht berücksichtigt.

17. Bestimmung von Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Aktivität in stimulierten Lymphozyten  
(in Anlehnung an Insel und Fenno, 1978)

a) Präparation des 100 000 x g Überstands

Nach der Zellernte wurde die Zellsuspension auf Eis gestellt, nach gründlichem Umschwenken in 50 ml Plastikröhrchen gegossen, die restlichen Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS-Puffer (s. Material 3c) überführt, das Medium abzentrifugiert (Christzentrifuge: 10 min, 1600 UpM, 4°C) und das Pellet mit PBS (0°C) gewaschen. Zur Bestimmung der Stimulation der Ornithin-Decarboxylase nach Con A-Zugabe (s. Fig. 37) wurden die Zellen nach dem ersten Waschen in 0.5 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorfgeläß überführt, den Rest der Zellen mit weiteren 0.5 ml PBS herausgespült und zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge: SS34-Rotor, Gummiadaptatoren, 10 min, 4000 UpM = 900 x g, 4°C). Nach dem Dekantieren des Waschpuffers wurden die Zellen

in eiskaltem hypotonischen Puffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM Dithioerythritol suspendiert (Endkonzentration:  $7 - 8 \times 10^7$  Zellen/ml, bezogen auf die eingesäte Zellzahl), in flüssigem  $N_2$  eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-196^\circ C$  aufbewahrt. Zur Gewinnung des Zellextrakts wurde die Suspension in Eiswasser aufgetaut und das Einfrieren und Auftauen noch einmal wiederholt. Das Lysat wurde je nach Menge in 5 ml Polyallomerröhrchen oder 0.5 ml Zentrifugenröhrchen (mit Adaptoren) überführt und 1 Stunde bei  $100\ 000 \times g$  im SW 65 Ti-Rotor (Beckman-Zentrifuge Modell L5-65:  $37\ 200\ UPM$ ,  $4^\circ C$ ) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde möglichst rasch für die Enzymtests verwendet.

b) Ornithin-Decarboxylase-Test

Die Ornithin-Decarboxylase-Aktivität wurde durch die Freisetzung von  $[^{14}C]CO_2$  aus DL- $[1-^{14}C]$ Ornithin nach Jänne und Williams-Ashman (1971) wie in Insel und Fenno (1978) beschrieben, bestimmt.

Die Inkubationsmischung enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.25 ml:

- 0.1 ml Zellextrakt (s. Methode 17a)
- 25  $\mu$ Mol Glycylglycin-Puffer pH 7.2
- 0.05  $\mu$ Mol Pyridoxal-5-phosphat
- 1.2  $\mu$ Mol Dithioerythritol
- 0.04  $\mu$ Mol (-) Ornithin (unmarkiert)
- 0.5  $\mu$ Ci DL- $[1-^{14}C]$ Ornithin (0.059 Ci/mMol)

Die Testmischung (Stammlösungen s. Material 3h) und gegebenenfalls Hemmstofflösungen (s. Tab. 15 und Material 3a) wurden in eiskalte, spitze Zentrifugengläser (15 x 100 mm) pipettiert, je 0.1 ml Zellextrakt zugesetzt und die Reaktion durch Aufwärmen auf  $37^\circ C$  im Wasserbad<sup>+</sup>) gestartet. Die Reagensgläser waren mit Gummikappen (Kontes, Vineland, USA, Nr. K 88 23 10)

---

<sup>+</sup>) Um Kondensation von Wasser an die aus dem Wasserbad ragenden Reagensglaswände zu vermeiden, wurde der Test in der Klimakammer bei  $37^\circ C$  durchgeführt.

verschlossen, an denen Polypropylengefäße (K 88 23 20) befestigt waren, die 0.2 ml Soluene 350 für die Absorption des freigesetzten [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> aufnahmen. Nach einer Inkubationsdauer von 60 (Tab. 15) bzw. 120 Minuten (Fig. 37) wurde die Reaktion durch Einspritzen von 1 ml 40 % Trichloressigsäure durch die Gummikappe beendet (Vorsicht Überdruck!). Die angesäuerte Reaktionsmischung wurde noch für 1 Stunde weiterinkubiert, um die Freisetzung von [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> aus dem Medium zu vervollständigen. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde der Inhalt des Polypropylengefäßes mit 8 ml Toluol-Zählflüssigkeit (s. Methode 10a) in ein Zählgläschen gespült und wie in Methode 10b beschrieben die Radioaktivität bestimmt.

Die Freisetzung von [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> aus dem Substrat nahm linear mit der Zeit für mindestens 90 Minuten zu (Fig. 5a; vgl. dazu Kay und Lindsay, 1973, Insel und Fenno, 1978) und war der eingesetzten Zellzahl bis mindestens  $8 \times 10^7$  Zellen/Test proportional (ohne Beleg).

c) S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Test

Die Putrescin aktivierte <sup>+) S-Adenosylmethionin-Decarboxylase-Aktivität wurde durch die Freisetzung von [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> aus S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]methionin in Gegenwart von 0.5 mM Putrescin nach Pegg und Williams-Ashman (1969) wie in Insel und Fenno (1978) beschrieben, bestimmt.</sup>

Die Testmischung enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.2 ml:

- 0.1 ml Zellextrakt (s. Methode 17a)
- 20 µMol Glycylglycin-Puffer pH 7.2
- 1.2 µMol Dithioerythritol
- 0.1 µMol Putrescin (wenn nicht anders angegeben; s. Fußnote)
- 0.007 µMol S-Adenosylmethionin (unmarkiert)
- 0.2 µCi S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]methionin (0.058 Ci/mMol)

---

<sup>+) Folgende Messung (Testbedingungen s. Tab. 16) belegt die absolute Putrescin-Abhängigkeit der S-Adenosylmethionin-Aktivität: - Zellextrakt 178 IpM; + Zellextrakt, - Putrescin 187 IpM; + Zellextrakt, + Putrescin 577 IpM.</sup>

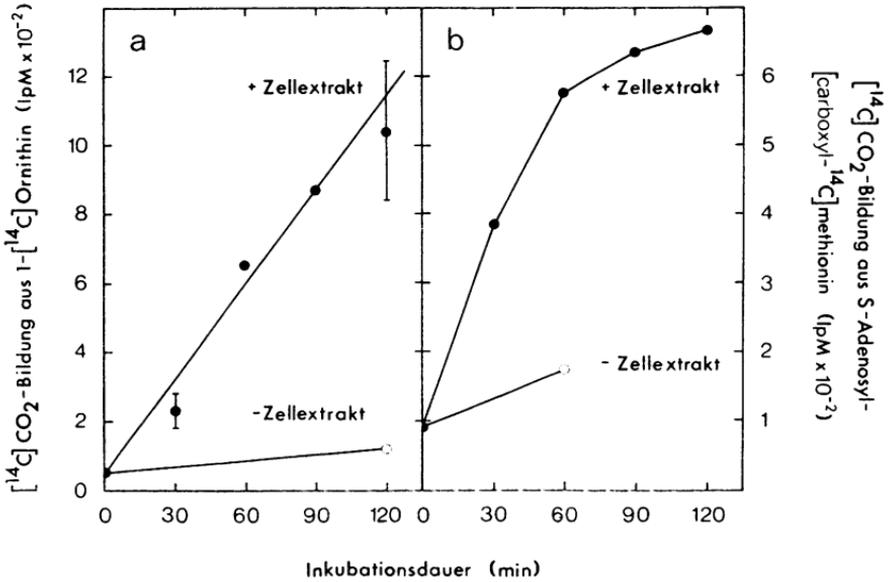


Fig. 5 Zeitabhängigkeit der  $^{14}\text{C}$   $\text{CO}_2$ -Bildung aus  
a) [1- $^{14}\text{C}$ ]Ornithin  
b) S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]methionin durch Lympho-  
zyten-Zellextrakt

Versuchsdurchführung wie in Tab. 15, 16; die Proben wurden jeweils unter abwechselnd lang bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (a) Doppelbestimmungen, b) Einfachbestimmungen).

- + Zellextrakt
- - Zellextrakt

Die Testdurchführung und die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie beim Ornithin-Decarboxylase-Test (Methode 11b). Die Freisetzung von  $^{14}\text{C}$   $\text{CO}_2$  aus dem Substrat nahm linear für rund 60 Minuten zu (Fig. 5b; vgl. Kay und Lindsay, 1973) und war der eingesetzten Zellzahl bis mindestens  $5 \times 10^7$  Zellen/ Test proportional (ohne Beleg).

18. Extraktion von RNA aus stimulierten Lymphozyten

(in Anlehnung an Wolf und Schlessinger, 1977)

Die radioaktiv markierten Zellen (Markierungsbedingungen s. Fig. 42, 43) eines Ansatzes mit und ohne Ovalicin wurden vereinigt, in eisgekühlte 50 ml Plastikröhrchen überführt und an das Kulturgefäß haftende Zellen nach dem Aufbrechen der Flaschen mit einem Stück Silikongummi abgeschabt, in 2 ml eiskaltem PBS (Material 3c) aufgenommen und mit der Hauptmenge vereinigt. Nach dem Abzentrifugieren des radioaktiven Mediums (Christ-Zentrifuge: 10 min, 1600 UpM, 4°C) wurde das Zellpellet mit einem halben Volumen PBS (0°C) gewaschen (Zentrifugation s.o.) und bis zur Extraktion der RNA in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

Die zur Extraktion verwendeten Geräte und Pipetten wurden mehrere Stunden bei 160°C sterilisiert. Die Mengenangaben beziehen sich auf 200 x 10<sup>6</sup> zu Versuchsbeginn eingesäte Zellen. Bei Extraktion der 'pulse-chase' markierten Zellen (s. Fig. 43) wurden die Volumina auf 1/3 reduziert. Alle Manipulationen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 0 - 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden im Eisbad aufgetaut und mit 2.5 ml Extraktionspuffer (0.1 M Trizma-base (Sigma, Taufkirchen), 0.01 M EDTA, 0.5 % Na-Dodecylsulfat, pH 5.4 mit Essigsäure eingestellt) versetzt. Das hochviskose Zellysate wurde in einen 25 ml Spitzkolben pipettiert und das Röhrchen mit 2.5 ml Extraktionspuffer nachgespült. Die vereinigten Lysate wurden gemischt (Cenko-Mix) und mit dem gleichen Volumen auf 70°C vorgewärmtes Phenol, das mit Extraktionspuffer (ohne Na-Dodecylsulfat) gesättigt war, versetzt, auf dem Cenco-Mix geschüttelt und auf Eis gestellt. Die Emulsion wurde anschließend 5 Minuten bei 55°C im Wasserbad heftig geschüttelt und die wässrige und die phenolische Phase durch Zentrifugation in kleinen Corexgläsern (Sorvall-Zentrifuge: SS 34 Rotor, 15 min, 10 000 x g, 4°C) getrennt. Die klare wässrige Phase (oben) wurde vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und in einen eiskalten Spitzkolben überführt. Die Phenolphase und die proteinhaltige Interphase wurden mit einem 1/2 Volumen eiskalten Extraktionspuffer versetzt und 10 Minuten bei 0°C geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit einem

1/2 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (1 : 1 : 0.01; v/v/v) durch 10 minutiges Schütteln bei 0 - 4°C extrahiert (Zentrifugation in kleinen Corexgläsern s.o.). Die wässrige Phase wurde in ein großes Corexglas überführt und zur Entfernung des gelösten Phenols mit 3 Volumina Äther 2 mal ausgeschüttelt (Zentrifugation s.o., jedoch 8000 x g). Die Ätherphase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgehoben und nach der zweiten Extraktion der verbliebene Äther im N<sub>2</sub>-Strom bei 0°C verblasen. Zur Ausfällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 2 Volumina Äthanol/0.15 M Na-Acetat (95 : 5; v/v) versetzt und über Nacht bei - 20°C gehalten. Die ausgefällte RNA wurde abzentrifugiert (s.o., jedoch für 1 h), der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet zur Entfernung des Na-Acetats mit 5 ml 95 % Äthanol gewaschen. Das nach dem Dekantieren im Glas verbleibende Äthanol wurde bei 0°C im N<sub>2</sub>-Strom verdampft und die RNA bei - 20°C aufbewahrt (Analyse der RNA s. Methoden 9b) und 10b).

#### 19. RNA-Synthese in isolierten Lymphozytenkernen

Der Einbau von [<sup>3</sup>H]UTP in isolierte Lymphozytenkerne wurde nach einer Vorschrift von Land und Schäfer (1977) gemessen. Jedoch wurden pro Test 2 x 10<sup>6</sup> anstatt 5 x 10<sup>6</sup> Kerne eingesetzt (Gewinnung des säureunlöslichen Kernlysats s. Methode 8d).

#### 20. DNase-Abbau von radioaktiv markiertem Chromatin

Zu 0.9 ml eiskalter DNase I-Lösung in Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer (11 µg pankreatische DNase I (Boehringer, Mannheim)/ml in 0.5 M Tris-HCl pH 7.0) wurde 0.1 ml der beschallten Chromatinsuspension (entspricht 3 x 10<sup>6</sup> zu Versuchsbeginn eingesäten Lymphozyten; s. Methode 13b) gegeben und die Reaktion durch Aufwärmen auf 37°C im Wasserbad gestartet. Nach verschiedenen Zeiten (s. Fig. 2) wurden die Proben auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 2 ml eiskalter 10 % Trichloressigsäure beendet. Das säureunlösliche Material wurde wie in Methode 8b beschrieben, abfiltriert und gewaschen (Bestimmung der filtergebundenen Radioaktivität s. Methode 10a).

## 21. Auswertung der Versuche und Fehlerrechnung

Wenn nicht anders angegeben, wurden für jede Messung 2 identische Proben angesetzt. Aus den beiden Werten wurde der Mittelwert errechnet und die Abweichung vom Mittelwert angegeben. Bei mehr als 2 Parallelproben wird neben dem Mittelwert die Standardabweichung (s) nach der folgenden Formel berechnet:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_1^i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} ; \quad x_i - \bar{x}: \text{Abweichung des } i\text{-ten Einzelwerts vom Mittelwert}$$

Zur Berechnung der Fehlerfortpflanzung bei Division wurde folgende Formel herangezogen:

$$\left(\frac{\Delta Z}{Z}\right)^2 = \left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2$$

$\Delta A, \Delta B$ : Absolute Abweichungen (bei 2 Parallelwerten) bzw. Standardabweichung (bei mehr als 2 Werten) der Meßwerte

A, B: Mittelwerte der Meßwerte

$\frac{\Delta Z}{Z}$ : relative (Standard)Abweichung (= Varianz) des Quotienten aus A und B

Darstellung der Ergebnisse:

In den Figuren wurde der Mittelwert mit einem Symbol dargestellt, die (Standard)Abweichung mit einem Balken wiedergegeben, wenn sie größer als das Symbol und mehr als 5 % des Mittelwerts betrug. Bei Pulskinetiken wurde immer das Ende des Pulses mit einem Symbol markiert.

Reproduzierbarkeit:

Im Flaschensystem lagen die relativen Fehler (Varianzen) bei Bestimmung von DNA-, RNA- und Proteinsynthese in Zellen im Durchschnitt unter 5 %; für die Größe der Varianz war es dabei unerheblich, ob man 2 Proben aus derselben Kulturflasche oder 2 Proben aus 2

parallel angesetzten Kulturflaschen miteinander verglich (s. z.B. Tab. 19; s. auch Richter, 1977).

## Ergebnisse

### A Zellselektivität der Ovalicinwirkung

#### 1. Werden lymphoide Zellen durch Ovalicin direkt beeinflusst?

Aus Tierversuchen ist bekannt, daß Ovalicin bevorzugt die Zellen des Immunsystems hemmt (Lazáry und Stähelin, 1968). Es war daher naheliegend, zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus lymphoide Zellsysteme zu verwenden (Weiner, 1976). Allen unfraktionierten Lymphozyten-Zellpräparationen ist gemein, daß sie neben vielen anderen Zellarten in geringer Anzahl Macrophagen enthalten (Golub, 1977). Diese spielen eine wichtige und offenbar unerläßliche Vermittlerrolle bei vielen immunologischen Vorgängen zwischen Antigen und den immunkompetenten Zellen (vgl. Übersichtsartikel von Persson et al., 1978; Unanue, 1978; Rosenstreich und Mizel, 1978). Es ist daher denkbar, daß die in lymphoiden Zellgemischen beobachteten Ovalicinwirkungen über die Hemmung der nicht zu den lymphoiden Zellen zählenden Macrophagen ausgelöst werden.

Um diese Frage zu entscheiden, wurde die Wirkung von Ovalicin auf S49.1-Lymphomazellen untersucht. Es handelt sich dabei um eine monoclonale, lymphoide Tumorzelllinie mit T-Zellcharakter aus einer Balb/c/st-Maus (Horibata und Harris, 1970). Versetzt man exponentiell wachsende S49.1-Zellen in Parallelansätzen mit verschiedenen Konzentrationen Ovalicin und mißt nach 36 Stunden den Einbau von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin in säureunlösliches Zellysate nach einem 1 stündigen Puls, so findet man eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ähnlich wie bei Concanavalin A (Con A)-stimulierten unfraktionierten Mäusemilzzellen nach 31 Stunden Ovalicineinwirkung (Fig. 6). Halbmaximale Hemmung (der Plateauwert entspricht dem Maximum) wird für Milzzellen bei  $4 \times 10^{-10}$  Mol/l, für S49.1-Zellen bei ungefähr  $7 \times 10^{-10}$  Mol/l Ovalicin erreicht.

Lymphoide Zellen sind also das direkte Ziel für Ovalicin bei Hemmung der Immunantwort, sodaß Macrophagen als primär gehemmte Zellen ausscheiden.

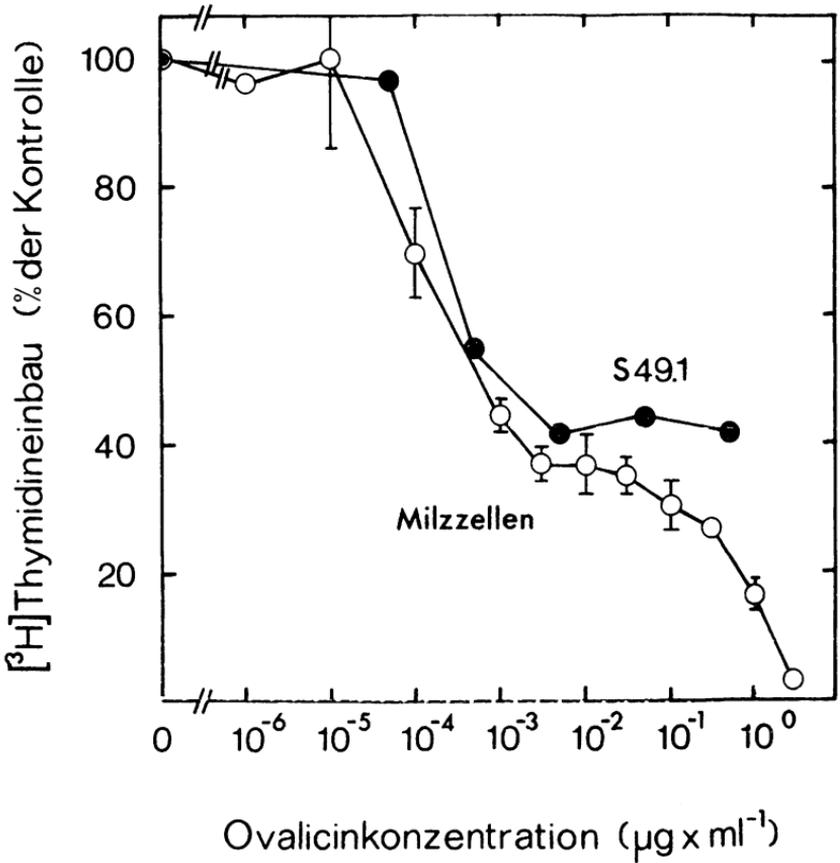


Fig. 6 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Ovalicin auf den Thymidineinbau Con A stimulierter Milzlymphozyten und S49.1-Lymphomazellen.

Zu Versuchsbeginn wurden Ansätze mit je  $8 \times 10^6$  für 12 h vorinkubierte, stimulierte Lymphozyten ( $1 \mu\text{g}$  Con A/ml,  $10^{-5}$  M 2-Mercaptoäthanol,  $2 \times 10^6$  Zellen/ml; vgl. Methode 4a $\beta$ ) und exponentiell wachsende S49.1-Lymphomazellen (s. Methode 4b) mit verschiedenen Ovalicin-Konzentrationen versetzt. 30 h bzw. 36 h später wurde den aufgewirbelten Zellsuspensionen je  $2 \times 0.9$  ml entnommen und in kleine Röhrchen gegeben (s. Methode 7a),  $1 \mu\text{Ci}$   $[^3\text{H}]$ Thymidin ( $0.5 \text{Ci/mMol}$ ) zugesetzt (s. Methode 7c) und nach 1 h der Einbau von Thymidin in das säureunlösliche Zelllysate bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

Werte ohne Hemmstoff (100 %): Lymphozyten  $20\ 896 \pm 820$  IpM  
S49.1-Zellen  $56\ 431 \pm 1304$  IpM

## 2. Hemmt Ovalicin den Thymidineinbau in nicht lymphoide Zellen?

Im letzten Abschnitt habe ich gezeigt, daß Ovalicin in Zellkultur lymphoide Zellen direkt hemmt. Ovalicin beeinflusst im Tierexperiment - an Ratten und Mäusen durchgeführt - bevorzugt die Zellen des Immunsystems (Lazáry und Stähelin, 1968). Sind daher Zellen nicht lymphoider Zelllinien gegen Ovalicin resistent?

Dazu wurde exemplarisch der Einfluß von Ovalicin auf HeLa- (transformierte Zellen aus menschlichem Cervixkarzinom) und 3T6-Zellen (transformierte Mäusefibroblasten), zwei nicht lymphoide Zelllinien, untersucht. Mißt man als Parameter für die Zellvermehrung den Einbau von [<sup>3</sup>H]Thymidin in das säureunlösliche Zellysat in 1 Stunden Pulsen zu unterschiedlichen Zeiten nach Toxinzugabe, so zeigen die Zellen bei Anwesenheit von  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin im Vergleich zu Kontrollkulturen nur eine geringfügig reduzierte, jedoch weiterhin exponentiell verlaufende Proliferation (Fig. 7a). Die Verdopplungsdauer der HeLa-Zellen verlängert sich von 14.6 Stunden auf 20.0 Stunden, die der 3T6-Zellen von 11.8 auf 13.4 Stunden. Daraus resultiert eine mit der Zeit langsam zunehmende Hemmung im Vergleich zur Kontrolle (Fig. 7b). Parallel dazu beobachtet man im Mikroskop einen leicht erhöhten Anteil toter, nicht anhaftender Zellen (ohne Beleg). Nach 48 stündiger Einwirkung ist erst eine 30 - 40 % Hemmung erreicht, während S49.1-Lymphomazellen bei gleicher Ovalicinkonzentration bereits zu 80 % inhibiert sind (Fig. 8; Hartmann et al., 1978).

HeLa- und 3T6-Zellen werden also im Vergleich zu S49.1- und Milzzellen (Fig. 8, 36) deutlich langsamer gehemmt. Die geringe Reduktion des [<sup>3</sup>H]Thymidineinbaus ist jedoch schon bei ähnlich niedrigen Ovalicinkonzentrationen meßbar (Fig. 8). Die differentielle Wirkung von Ovalicin auf das Immunsystem im Tier scheint also durch eine raschere Ausprägung der Hemmung in lymphoiden Zellen bedingt zu sein, vorausgesetzt es lassen sich die Ergebnisse von permanenten Zelllinien auf normale Zellen übertragen.

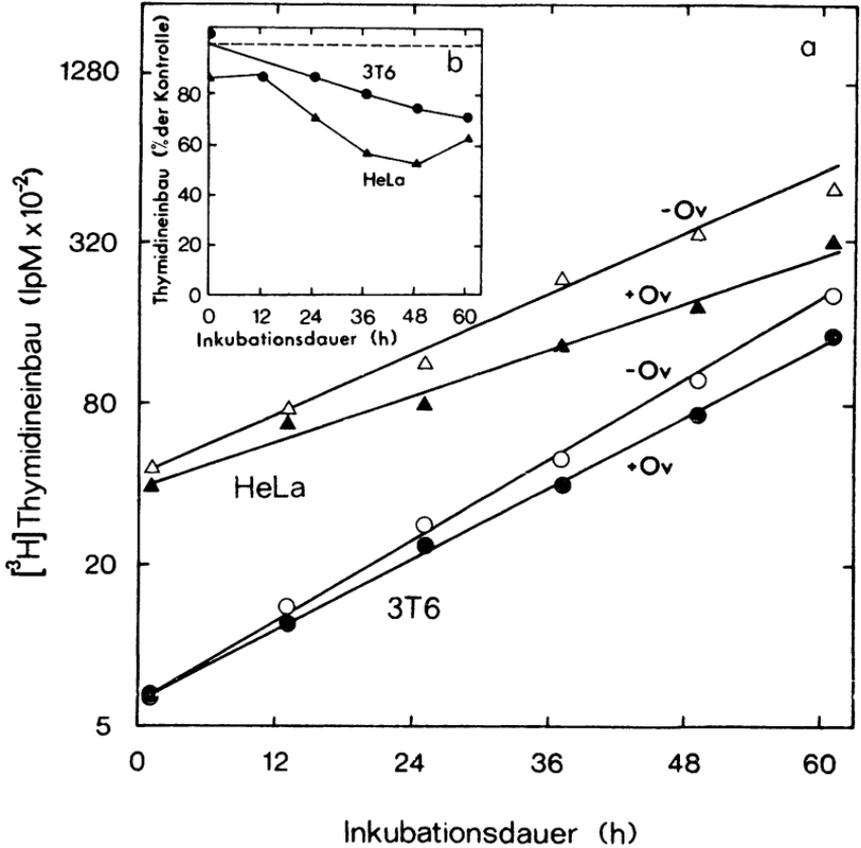


Fig. 7 Einfluß von Ovalicin auf die Kinetik der DNA-Synthese von HeLa- und 3T6-Zellen

Exponentiell wachsenden HeLa- bzw. 3T6-Zellen (Kultivierung s. Methode 4c) wurde in 20 µl BSS (s. Material 3a) Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M zugesetzt. Die Kontrollen erhielten das gleiche Volumen BSS. 1 h vor den angegebenen Zeiten wurde den Kulturen 2 µCi [<sup>3</sup>H]Thymidin (resultierende Konzentration: 1 µCi/ml; spezifische Radioaktivität: 6 Ci/mMol (HeLa), 0.1 Ci/mMol (3T6)) zupipettiert und nach Ende des 1 h Pulses der Einbau von Thymidin in das säureunlösliche Zelllysate ermittelt (s. Methoden 8aß, 10a).

- a) Kinetik der DNA-Synthese von HeLa- und 3T6-Zellen ± Ovalicin  
 △, ▲ HeLa-Zellen; ○, ● 3T6-Zellen; △, ○ - Ovalicin; ▲, ● + Ovalicin
- b) Kinetik der DNA-Synthesehemmung: ▲ HeLa, ● 3T6-Zellen

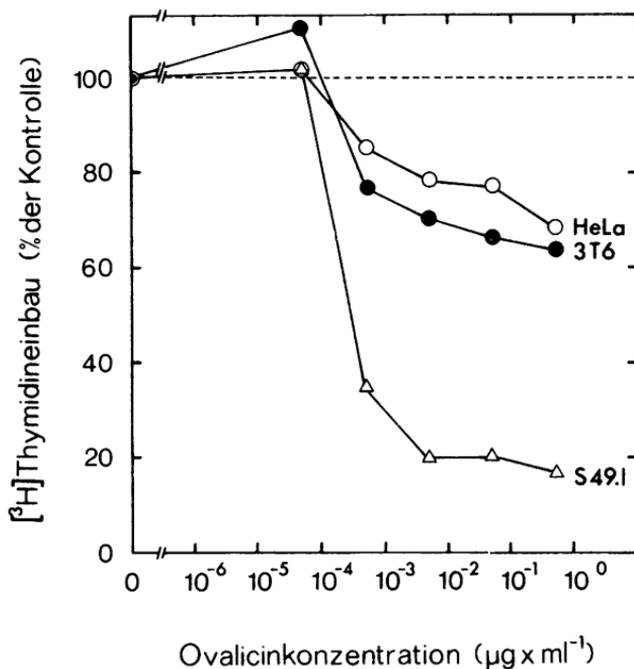


Fig 8. Vergleich der Wirkung verschiedener Ovalicinkonzentrationen auf den Thymidineinbau von S49.1-, HeLa- und 3T6-Zellen

S49.1-Zellen: Versuchsdurchführung wie in Fig. 6; Messung des Thymidineinbaus jedoch zwischen der 48. - 49. h nach Ovalicinzugabe.

3T6- und HeLa-Zellen: Versuchsdurchführung wie in Fig. 7; jedoch erhielten die Zellen zu Versuchsbeginn verschiedene Konzentrationen Ovalicin und  $[^3\text{H}]$ Thymidin ( $0.5 \text{ Ci}/\text{mMol}$ ) wurde 48 h nach Ovalicinzugabe für 1 h angeboten.

100 %-Werte:	HeLa (○)	1 332 ± 25	IpM
	3T6 (●)	12 861 ± 208	IpM
	S49.1 (△)	70 820 ± 340	IpM

### 3. Wirkt Ovalicin selektiv auf Lymphozytensubpopulationen?

#### a) Untersuchung des durch Ovalicin nicht hemmbaren Thymidineinbaus

$\alpha$ . Kinetik des Thymidineinbaus Con A stimulierter Lymphozyten in Gegenwart von Ovalicin

$2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin hemmt den Thymidineinbau von Milzzellen zu 65 %, 30 Stunden nach Con A-Zugabe gemessen (Fig. 6). Kann man diese Hemmung auch zu frühen Zeiten nach Mitogenstimulation beobachten? Lymphozyten treten aus einem metabolisch relativ inaktiven Ruhezustand nach Lektinkontakt in eine Phase hoher metabolischer Aktivität, die zu DNA-Replikation und schließlich zur Zellteilung führt (Ling und Kay, 1975). Stimuliert man Mäusemilzzellen mit optimalen Dosen Con A, so findet man nach 18 - 20 Stunden einen rasch zunehmenden Thymidineinbau, mit einem Maximum 48 Stunden nach Lektinzugabe (Fig. 35; Malkinson und Wang, 1978; Usher und Reiter, 1977).

Beginnt man nun in kurz aufeinander folgenden 1 Stunden Pulsen den [ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbau in säureunlösliches Zellysat<sup>+</sup>) sofort nach Mitogenzugabe zu messen, so findet man bereits nach 8 - 10 Stunden eine Zunahme des DNA-Vorläufereinbaus (Fig. 9). Dieser außerordentlich geringe Einbau von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin<sup>++</sup>) wird deutlich durch  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin gehemmt (Fig. 9). Allerdings ist die Hemmung unvollständig; es bleibt eine nicht hemmbare Restaktivität von ca. 30 - 40 % (Fig. 9; vgl. Fig. 6), die auch nach längerer Einwirkungsdauer noch vorhanden ist (vgl. Weiner, 1977). Eine zu niedrige Ovalicindosis als Ursache der unvollständigen Hemmung scheidet aus, da selbst

---

<sup>+</sup>) Bei diesem markierten, in kalter Trichloressigsäure unlöslichen Material handelt es sich zum großen Teil um DNase-labile Polymere und damit vermutlich um DNA (Fig. 2).

<sup>++</sup>) 12 h nach Mitogenzugabe wird nur rund 1 % der maximalen Einbaurrate erreicht. Maximale DNA-Synthese findet man ungefähr 48 h nach Con A-Stimulation (vgl. Fig. 35).

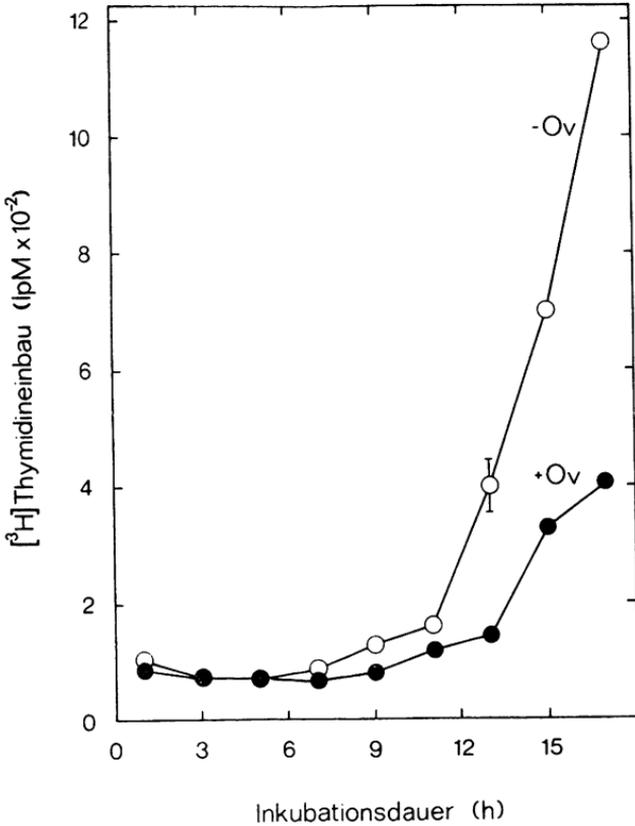


Fig. 9 Hemmung des Thymidineinbaus stimulierter Lymphozyten durch Ovalicin in den ersten Stunden nach Con A-Zugabe

2 Kulturen mit jeweils  $85 \times 10^6$  Zellen ( $1.7 \times 10^6$ /ml) wurden nach 10 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) stimuliert. Eine Kultur erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin zu einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. 1 h vor den angegebenen Zeiten wurden den Zellsuspensionen Proben entnommen (Methode 7a) und der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $0.5 \text{ Ci/mMol}$ ) in säureunlösliches Zelllysats innerhalb 1 Stunde bestimmt (Methoden 7c, 8a $\beta$ , 10a).

- - Ovalicin
- + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

eine 100 - 1000 fach höhere Toxinkonzentration die Hemmung nicht entscheidend erhöht (Fig. 6, 12; Weiner, 1976). Erst wenn Ovalicin 36 - 48 Stunden eingewirkt hat, verringert sich die DNA-Synthese langsam (s. Fig. 36). Die bei Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{g}$  Ovalicin/ml beobachtete Zunahme der Hemmung ist wahrscheinlich auf unspezifische Wechselwirkungen des Toxins mit Zellbestandteilen zurückzuführen. Die absolute Größe der Restsynthese wird von vielen Faktoren beeinflusst, wie z.B. von der Art des Zellkulturgefäßes (s. Anhang), 2-Mercaptoäthanolzusatz zum Kulturmedium (s. Anhang), von der Zelldichte (Weiner, 1976) und Meßzeitpunkt der DNA-Synthese (Fig. 11, 36).

#### **β. Abhängigkeit von der Thymidinkonzentration**

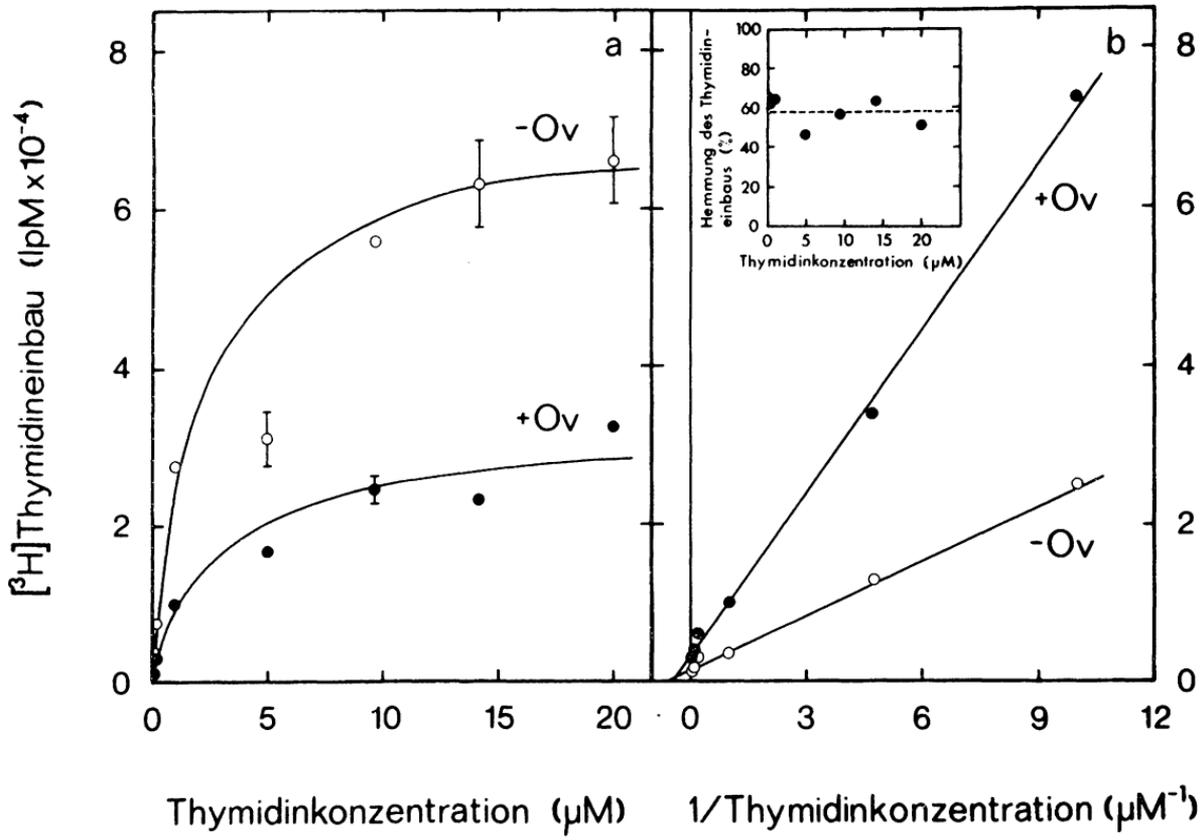
Die bisherigen Überlegungen zur unvollständigen Hemmung des Thymidineinbaus setzten voraus, daß die gemessene Inkorporation des DNA-Vorläufers in säureunlösliches Zellysat linear mit der DNA-Syntheseaktivität korreliert. Thymidineinbau ist dann ein richtiges Maß für DNA-Synthese, wenn der Einbau unabhängig von der Substratkonzentration gemessen werden kann. Nach Literatur (Iing und Key, 1975) nimmt der Thymidineinbau in stimulierte Lymphozyten mit steigenden Thymidinkonzentrationen zu und erst bei Konzentrationen von  $80 \mu\text{M}$  Thymidin im Medium wird Sättigung des Thymidin inkorporierenden Systems erreicht.

Die von mir verwendeten Thymidinkonzentrationen im Medium lagen in den meisten Experimenten aus Kostengründen bei  $2 \mu\text{M}$

Fig. 10 Einfluß der Thymidinkonzentration auf die Hemmung der DNA-Synthese Con A stimulierter Milzzellen durch Ovalicin

Jeweils  $33 \times 10^6$  Zellen erhielten nach 12 stündiger Vorinkubation pro ml  $1 \mu\text{g}$  Con A, 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-2}$  M) und gegebenenfalls Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M) (s. Methode 4aβ). 36 h nach Mitogenzugabe wurden Proben entnommen (s. Methode 7a) und den Zellen verschiedene Mengen  $[^3\text{H}]$ Thymidin ( $0.5 \text{ Ci/mMol}$ ) für 2 h angeboten (s. Methode 7c). Die Radioaktivität im säureunlöslichen Zellysat wurde nach Methode 8aβ und 10a bestimmt.

- a) Thymidineinbau als Funktion der Thymidinkonzentration
- b) Doppelt reziproker Auftrag der Meßwerte (a) nach Lineweaver-Burk  
inset: Hemmung des Thymidineinbaus in Abhängigkeit von der Thymidinkonzentration



1/Thymidineinbau ( $\text{lpM}^{-1} \times 10^4$ )

(1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; spezifische Radioaktivität: 0.5 Ci/ $\mu\text{Mol}$ ), teilweise sogar mit 0.15  $\mu\text{M}$  (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 6.7 Ci/ $\mu\text{Mol}$ ) besonders weit unterhalb des Sättigungsplateaus. Daher erschien es mir wichtig den Thymidineinbau in säurefällbares Zellysate von Milzzellen mit und ohne Ovalicin bei unterschiedlichen Thymidinkonzentrationen zu messen. Sättigung des Thymidineinbausystems - gemessen 36 - 38 Stunden nach Con A-Zugabe - tritt mit und ohne Ovalicin bei ähnlichen Konzentrationen auf (Fig. 10a). 50 % Sättigung wird bei 1.6  $\mu\text{M}$  ohne bzw. mit Ovalicin bei 2.1  $\mu\text{M}$  Thymidin erreicht (Fig. 10b). Gerhart et al. (1976) finden für Con A-stimulierte Thymozyten einen etwas tiefer liegenden scheinbaren  $K_m$ -Wert von 0.6  $\mu\text{M}$ . Trägt man nun die Hemmung durch Ovalicin als Funktion der Thymidinkonzentration auf, so ist im Rahmen der Streubreite keine Abhängigkeit feststellbar (inset Fig. 10b). Damit kann man eine einseitige Beeinflussung der Größe oder Sättigungsgeschwindigkeit des Thymidinpools durch Ovalicin ausschließen (vgl. Venkatesan, 1977). Die Hemmung des Thymidineinbaus spiegelt somit eine erniedrigte DNA-Syntheseleistung wider.

#### y. Einfluß von Ovalicin auf die DNA-Reparatursynthese

Einbau von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin in hochmolekulares, säurefällbares Material ist nicht ausschließlich eine Meßgröße für DNA-Replikation. Durch Reparatursynthese können fehlerhafte Stellen der DNA herausgeschnitten und durch Einfügen der richtigen Folge von Nukleotiden ersetzt werden. Über den radioaktiv-markierten Thymidinpool kann hierbei [ $^3\text{H}$ ]Thymidin in die DNA gelangen. Damit ergeben sich 3 Möglichkeiten: Ovalicin kann einmal die Replikation, zum anderen die durch Hydroxyharnstoff<sup>4)</sup> nicht hemmbare Reparatursynthese (Cleaver, 1969) hemmen, oder

---

<sup>4)</sup> Hydroxyharnstoff verhindert durch Hemmung des Ribonukleosiddiphosphat-Reduktasekomplexes die Bildung von Desoxyribonukleotiden.

Deshalb wird die DNA-Replikation, für die große Mengen Desoxyribonukleotide benötigt werden, sehr empfindlich gehemmt.

Tab. 4 Thymidineinbau ungehemmter und Ovalicin gehemmter Lymphozyten in Gegenwart von Hydroxyharnstoff

2 Kulturflaschen mit je  $100 \times 10^6$  Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden nach 14 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). 1 Flasche wurde gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M) zugesetzt. 23 h nach Mitogenzugabe wurden 0.9 ml Proben entnommen (s. Methode 7a) und zu einem Teil in 50  $\mu\text{l}$  BSS  $100 \mu\text{g}$  Hydroxyharnstoff (Endkonzentration:  $1.3 \text{ mM}$ ) zugegeben. 1 h später wurde den Zellen für 1 h [ $^3\text{H}$ ]Thymidin ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $0.5 \text{ Ci/mMol}$ ) angeboten (s. Methode 7c) und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

Ovalicin	[ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbau (IpM)	
	- Hydroxyharnstoff	+ Hydroxyharnstoff
-	6 984 $\pm$ 421	129 $\pm$ 8
$2 \times 10^{-7}$ M	2 471 $\pm$ 67	75 $\pm$ 5

beide Vorgänge gleichzeitig unterdrücken.

Aus 2 parallel stimulierten Lymphozytenkulturen, von denen eine gleichzeitig mit Con A  $2 \times 10^{-7}$  Mol/l Ovalicin erhalten hatte, wurden 23 Stunden nach Mitogenzusatz 0.9 ml Proben entnommen. Die Hälfte der Proben mit und ohne Ovalicin erhielt  $1.3 \times 10^{-3}$  Mol/l Hydroxyharnstoff (Endkonzentration) - eine Konzentration, die ohne Einfluß auf die Reparatursynthese ist (Robbins und Kraemer, 1972) -, während die restlichen Proben als Kontrollen dienten. Mißt man 1 Stunde später in einem 1 Stunden [ $^3\text{H}$ ]Thymidinpuls die DNA-Synthese, so findet man nur noch ungefähr 1 % des Thymidineinbaus im Vergleich zu Proben ohne Hydroxyharnstoff (Tab. 4). Der in Gegenwart von Ovalicin verbleibende Thymidineinbau stellt also wahrscheinlich keine DNA-Reparatursynthese dar, da er ebenfalls wie die DNA-Synthese in den Zellen ohne Ovalicin praktisch vollständig durch Hydroxyharnstoff gehemmt wird. Ovalicin beeinflusst daher weit-

gehend die DNA-Replikation, da der Anteil der Reparatursynthese an der Gesamt-DNA-Synthese gering zu sein scheint.

8. Einfluß von Ovalicin auf den Thymidineinbau zwischen der 15. und 30. Stunde nach Con A-Zugabe

Was ist nun aber die Ursache für die unvollständige Hemmung der DNA-Replikation? Sehr wahrscheinlich die Heterogenität der verwendeten Zellen, die eine Mischung verschiedener Lymphozytenpopulationen darstellen und sich in Art und Entwicklungszustand unterscheiden. Hierfür erbrachte die Analyse der DNA-Synthesekinetik in kurz aufeinanderfolgenden [ $^3\text{H}$ ]Thymidinpulsen zwischen der 15. und 30. Stunde nach Con A-Zugabe die ersten Hinweise. Untersucht man die DNA-Synthese Con A-stimulierter Milzzellen in einstündigen [ $^3\text{H}$ ]Thymidinpulsen, so findet man überraschenderweise in der Kontrollkultur ungefähr 20 Stunden nach Con A-Zugabe außerhalb der Fehlerbreite<sup>+)</sup> eine zeitlich begrenzte, beschleunigte Zunahme der Thymidineinbaurrate (Fig. 11a). Nach ungefähr vier Stunden verläuft der Einbau im untersuchten Zeitintervall wieder exponentiell, jedoch deutlich langsamer als zwischen der 15. und 21. Stunde (Fig. 11b). In Gegenwart von Ovalicin wiederholt sich der zeitliche Verlauf des Thymidineinbaus nicht einfach auf reduziertem Niveau. Über lange Zeit bauen Ovalicin-gehemmte Zellen mit annähernd gleicher, exponentieller Zunahme Thymidin ein (Fig. 11b). Daraus resultiert eine unterschiedliche Hemmung des Thymidineinbaus zu verschiedenen Zeiten nach Lektinzusatz (Fig. 11a inset). Um ein Artefakt in den Kulturbedingungen auszuschließen, wurde die Hemmung des Thymidineinbaus in drei weiteren von einander unabhängigen Versuchen, hierbei jedoch nur zur 22. und 30. Stunde, bestimmt. Auch diese Versuche ergaben einen deutlichen Unterschied zwischen den Hemmwerten (Fig. 12).

Was kann nun diese zeitlich begrenzte Änderung der DNA-Synthese-Hemmung (Fig. 11a inset; Fig. 12) bedeuten? Eine unterschiedliche

---

<sup>+) Die doppelt bestimmten Meßwerte wichen im Durchschnitt um 2.4 % vom Mittelwert ab.</sup>

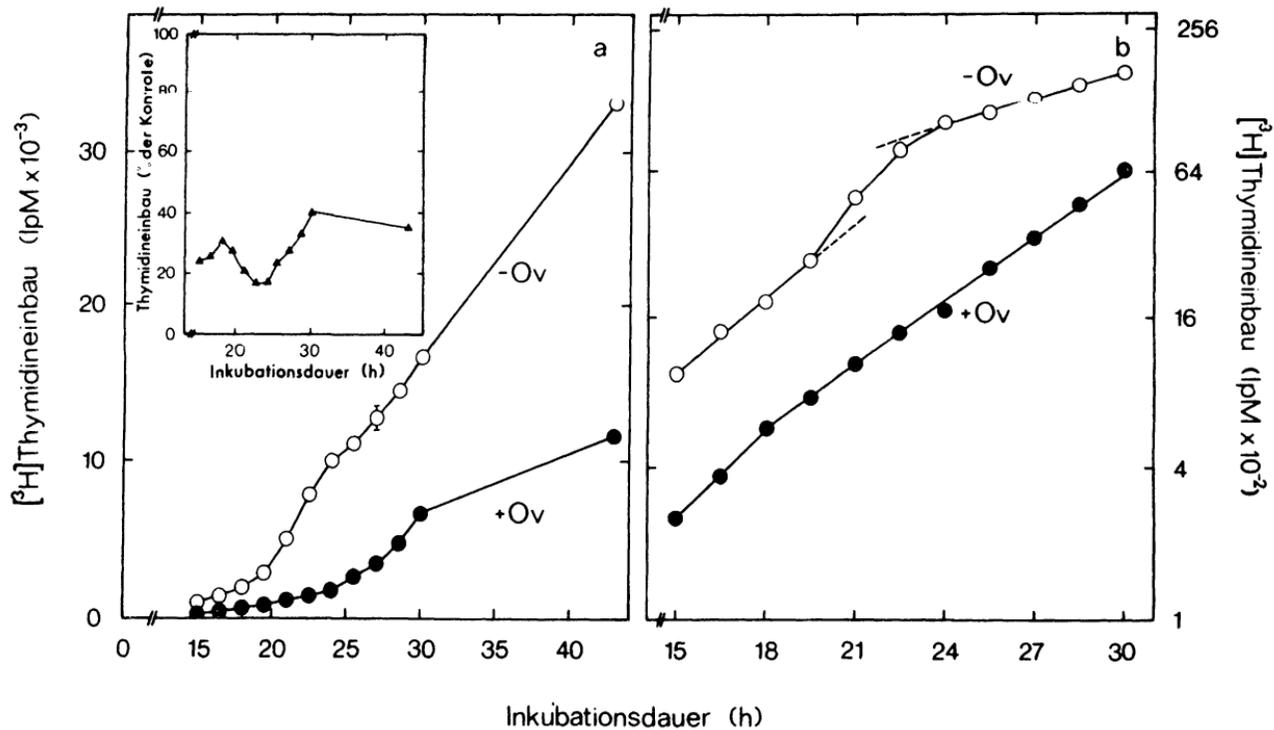


Fig. 11 Wirkung von Ovalicin auf die Kinetik des Thymidineinbaus stimulierter Milzzellen 15 - 30 Stunden nach Con A-Zugabe (Legende s. nächste Seite)

Fig. 11 Wirkung von Ovalicin auf die Mitotik des Thymidinein-  
bau-stärkender Milozellen 15 - 20 Stunden nach  
Con A-Zugabe

2 Ansätze mit je  $6 \times 10^6$  Zellen ( $1.5 \times 10^6$ /ml) wurden nach 9 stündiger Vorinkubation wie in Fig. 6 beschrieben, stimuliert. 1 Kultur erhielt gleichzeitig mit Con A Ovalicin in einer Endkonzentration von  $3 \times 10^{-4}$  M. 1 h vor dem in der Abszisse angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen (s. Methode 7a) und der Einbau von [ $^3$ H]-Thymidin (1  $\mu$ Ci/ml; 0.5 Ci/mMol) während 1 h bestimmt (s. Methoden 8aß, 10a).

a) Thymidineinbau zu verschiedenen Zeiten nach Con A- und Ovalicinzugabe  
inset: Nennung des Thymidineinbaus als Funktion der Ovalicin-Wirkdauer

b) Halblogarithmische Auftragung der Meßwerte von (a)

Fig. 11 s. vorangegangene Seite

Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Ovalicin zu verschiedenen Zeiten nach Mitogenzugabe scheidet aus, da die Hemmung unabhängig vom Meßzeitpunkt ( $t = 25$  oder  $50$  h nach Con A-Zugabe) bei ca.  $3 \times 10^{-4}$  M. Ovalicin/ml auftritt (Tab. 10).

Lymphozyten werden durch mitogene Lektine nicht alle gleichzeitig stimuliert, sodaß die Zellen asynchron proliferieren. Dadurch treten sie zu sehr unterschiedlichen Zeiten nach Mitogenkontakt - im Extremfall mit mehreren Tagen Differenz - zum ersten Mal in die S-Phase ein (Sören, 1973; Jasinska et al., 1970; Steffen und Stolzmann, 1969). Die Ursache dafür kann in der Variabilität der G<sub>1</sub>-Phasenlänge individueller Zellen oder von Subpopulationen liegen. Von Con A ist bekannt, daß es direkt nur bestimmte Subpopulationen von T-Lymphocyten zur Proliferation anregt (Frelinger, 1977; Andersson et al., 1972). In einem B/E-Zellgemisch können wahrscheinlich B-Zellen über lösliche Faktoren aktiviert werden, die Con A-stimulierte T-Zellen sezernieren (Andersson et al., 1972; weitere Beispiele für Con A-Stimulierung von B-Zellen in Coutinho et al., 1975; Alencastre und Borden, 1975; Nagraby et al., 1975; Janossy et al., 1973).

Für das zuvor beschriebene Experiment ergibt sich daraus als mögliche Erklärung, daß nach Mitogenzugabe zeitlich versetzt



Man sollte allerdings noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diesen Effekt im Auge behalten. Die Geschwindigkeit der Metabolisierung von exogen angebotenen Thymidin ändert sich während des 'Lymphozytenzellzyklus' (Usher und Reiter, 1977). Wenn Ovalicin diese Vorgänge beeinflusst, könnte dies durch Änderung der spezifischen Aktivität des Thymidins einen von den Kontrollzellen abweichenden Thymidineinbau vortäuschen.

b) Analyse des Thymidineinbaus einzelner Lymphozyten

Die unvollständige Hemmung des Thymidineinbaus durch Ovalicin als Folge der Heterogenität der Zellen läßt sich aber auf Grund der folgenden Erklärung auch durch die Analyse der DNA-Synthese in einzelnen Zellen prüfen:

Nur ein Teil der Zellen ist sensitiv gegenüber Ovalicin. Es gibt Subpopulationen, die durch Ovalicin nicht beeinflusst werden. Ihre DNA-Synthese wird als Restsynthese sichtbar.

Trifft diese Erklärung nicht zu, so sollten alle proliferierende Zellen durch Ovalicin in gleichem Maße gehemmt werden. Die Hemmung kann dann aber nicht vollständig sein, so daß bei allen Zellen eine gleichgroße Restaktivität der DNA-Synthese bleibt. Dies wäre z.B. der Fall bei Verminderung der Replikationsgeschwindigkeit der DNA (vgl. Fillingame et al. 1975).

Das Ergebnis der Feinanalyse der DNA-Synthesekinetik läßt vermuten, daß die erste Erklärung zutrifft.

Mit Hilfe autoradiographischer Methoden kann man den Thymidineinbau einzelner Zellen qualitativ und quantitativ messen (s. z.B. Hünig et al., 1974). Markiert man die DNA von Lymphozyten mit einem radioaktiven Isotop, indem man für bestimmte Zeiten [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin als DNA-Vorläufer im Kulturmedium anbietet, so ist es möglich, nach Autoradiographie der Zellen in einer strahlungsempfindlichen Fotoemulsion für jede Zelle die DNA-Syntheseaktivität qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Findet man in der näheren Umgebung einer Zelle eine über der Hintergrundmarkierung liegende Anzahl von Silberkörnern, so hat die Zelle [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin aufgenommen. Die Zahl der Körner

ist ein Maß für die während des Pulses synthetisierte DNA<sup>+</sup>). Welches Ergebnis würde man nun erwarten, wenn die zuerst angegebene Deutung nicht zutrifft? Bei gleichmäßiger Hemmung des Thymidineinbaus sollte der Anteil markierter Zellen in gehemmten und ungehemmten Lymphozytenkulturen gleich groß sein. Die durchschnittliche Anzahl der Silberkörnchen pro markierter Zelle sollte jedoch in Gegenwart von Ovalicin, entsprechend der Hemmung des Thymidineinbaus in säurefällbares Zellysat, reduziert sein.

Gilt die zuerst angegebene Deutung, so wird das umgekehrte Ergebnis erwartet, vorausgesetzt die resistenten Subpopulationen synthetisieren DNA mit gleicher Geschwindigkeit wie die übrigen Zellen.

Analysiert man nun die in einem vierstündigen [<sup>14</sup>C]Thymidinpuls zwischen der 36. und 40. Stunde nach Con A- und Ovalicin-zugabe (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M) markierten Lymphozyten nach Entwicklung der Autoradiographie, so findet man im Vergleich mit Kontrollzellen ohne Ovalicin nur eine 15 % Reduktion des Thymidineinbaus in einzelne Zellen (Tab. 5)<sup>++</sup>).

---

+) Hierbei geht man von der vereinfachenden Annahme aus, daß die Größe des Thymidinpools im Vergleich zum in DNA-eingebauten Thymidin zu vernachlässigen ist und Zellen außerhalb der S-Phase kein exogenes Thymidin in den zellulären Pool aufnehmen. In der Tat beträgt der Anteil der säurelöslichen Radioaktivität - in einem orientierenden Versuch gemessen - nur rund 10 % der während eines 2 h [<sup>3</sup>H]Thymidinpulses (spezifische Radioaktivität: 6 Ci/mMol) in säurefällbare Polymere eingebaute Radioaktivität. Weiterhin spricht das selektive Überleben von nicht in S-Phase befindlicher Zellen bei [<sup>3</sup>H]Thymidingaben hoher spezifischer Aktivität ('hot pulse technique' nach Dutton und Mishell, 1967; Andersson und Melchers, 1974) für eine Kopplung zwischen DNA-Synthese und Thymidinaufnahme, so daß nicht in DNA-Synthese befindliche Zellen nicht markiert werden dürften.

++) Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Thomas Hünig 1977 durchgeführt.

Tab. 5 Einfluß von Ovalicin auf den Thymidineinbau einzelner, Con A stimulierter Milzzellen

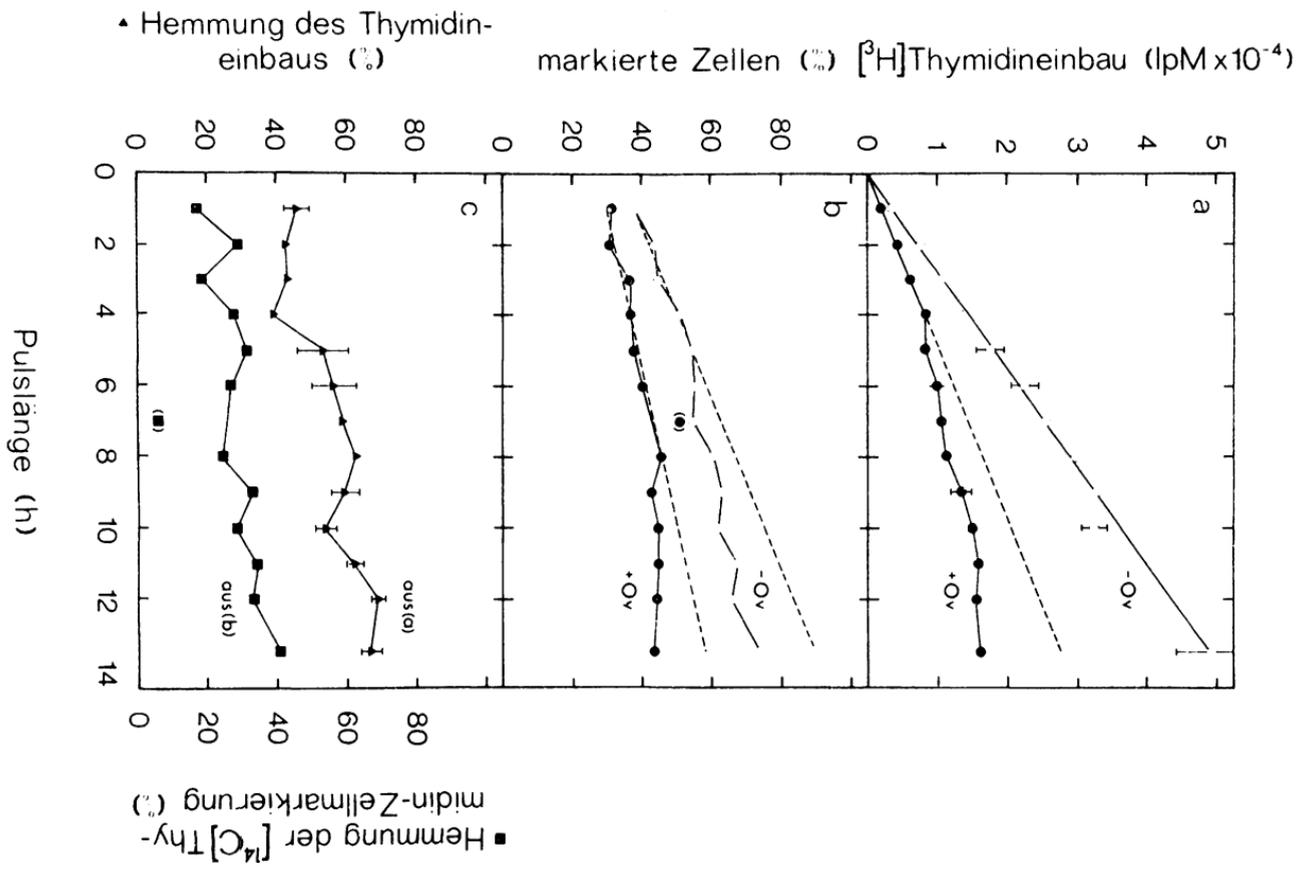
2 Ansätze mit je  $33 \times 10^6$  Zellen wurden ohne Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mer-  
captoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Eine Kultur erhielt zusätzlich mit dem Mitogen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. 36 h nach Mitogenzugabe wurden je Kultur  $4 \times 0.9$  ml Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a) und die Hälfte der Proben für 4 h mit [ $^3\text{H}$ ]Thymidin ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $5.7 \text{ Ci/mMol}$ ), die andere Hälfte mit [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $0.062 \text{ Ci/mMol}$ ) inkubiert. Von den [ $^3\text{H}$ ]markierten Zellen wurde die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a). Die [ $^{14}\text{C}$ ]markierten Zellen wurden für die Autoradiographie präpariert (s. Methode 11ba), 2 Tage exponiert (s. Methode 11b $\beta$ ), Giemsa gefärbt (s. Methode 11b $\gamma$ ) und die Anzahl markierter Zellen und ihre Markierungsstärke bestimmt (s. Methode 11b $\delta$ ).

	- Ovalicin	+ Ovalicin	Hemmung (%)
Anteil markierter Zellen (%)	48	34	30
durchschnittliche Anzahl von Silberkörnern/Zelle	144	123	15
[ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbau (IpM)	23 541 $\pm 1 656$	13 155 $\pm 432$	44

Dagegen konnte man eine deutliche Verringerung der Anzahl Thymidin inkorporierender Zellen messen (30 % Hemmung; Tab. 5). Die Reduktion des Anteils markierter Zellen durch Ovalicin entspricht weit mehr der in Parallelansätzen bestimmten Hemmung des Thymidineinbaus in säureunlösliches Zelllysate von 44 % (Tab. 5), als die Hemmung der DNA-Synthese einzelner Zellen. In 3 von 4 Versuchen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Diese Resultate deuten hin auf eine bevorzugte Hemmung von Lymphozytensubpopulationen durch Ovalicin.

Die in Gegenwart von Ovalicin gefundene Reduktion der Zahl markierter Zellen ist allerdings immer signifikant kleiner als die Hemmung des Thymidineinbaus in den säurefällbaren Anteil des Zelllysats (vgl. Tab. 5). Eine Erklärungsmöglichkeit ist die Erniedrigung der Zahl markierter Zellen durch Bildung schlecht auswertbarer Zellaggregate, die sich hauptsächlich aus großen, markierten Zellen zusammensetzen (eigene Beobachtungen; Ling und Kay, 1975). Ovalicin gehemmte Lymphozyten aggregieren jedoch auch unter dem Einfluß von Con A, möglicherweise in geringerem Ausmaß (ohne Beleg). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß bei autoradiographischer Analyse von nur schwach durch Mercaptoäthanol stimulierte Milzzellen (vgl. Fig. 35; Lemke und Opitz, 1976; Opitz et al., 1978; Goodman und Weigle, 1977) und von Con A-aktivierten Milzlymphozyten, bereits 20 Stunden nach Lektinzugabe - in beiden Fällen ist die Zellaggregatbildung gering - die Reduktion des Anteils der markierten Zellen durch Ovalicin größer ist und somit besser mit der direkt gemessenen Hemmung des Thymidineinbaus übereinstimmt (ohne Beleg). Allerdings kann die Diskrepanz zwischen der Hemmung des Thymidineinbaus durch Ovalicin und der Reduktion des Anteils markierter Zellen nicht ausschließlich auf Meßfehler durch die unterschiedliche Aggregation der Zellen zurückgeführt werden, da sich ähnliche Unterschiede ergeben, wenn man bei der Auswertung der Autoradiographie nur isolierte Einzelzellen berücksichtigt (ohne Beleg).

Zur genaueren Analyse dieser Diskrepanz wurde die Markierungsgeschwindigkeit der Lymphozyten mit und ohne Ovalicin bestimmt. 39 Stunden nach Con A-Zugabe wurde zu gleichzeitig aus Kulturflaschen entnommenen Zellproben [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin zugegeben. Hierauf wurde stündlich je eine Probe mit und ohne Hemmstoff auf Eis gestellt und für die Autoradiographie vorbereitet. Parallel dazu wurde die Hemmung des Thymidineinbaus in das säureunlösliche Zelllysate bestimmt (Fig. 13a). Man beobachtet bei den Kontrollzellen im untersuchten Zeitintervall von 39 bis 52,5 Stunden nach Con A-Zugabe eine weitgehend konstante Synthesegeschwindigkeit, während sie mit Ovalicin nach 4 Stunden abfällt (Fig. 13a). Daraus resultiert eine von 45 % ( $t = 39$ ) auf 70 % ( $t = 52,5$ ) zunehmende Hemmung des Thymidineinbaus bei Anwesenheit von Ovalicin (Fig. 13c; vgl. auch Fig. 36).



Der Zunahme des Thymidineinbaus in säureunlösliches Zellysat entspricht einer Anhäufung markierter Zellen. Nach einer anfänglich linearen Zunahme des Anteils markierter Zellen in der Kontrollkultur ohne Ovalicin von 38 % auf 55 % wird der Zuwachs nach 6 Stunden langsamer (Fig. 13b). Nach 13.5 Stunden sind fast 3/4 aller Zellen markiert. Eine geringfügig höhere Markierungsrate Con A-stimulierter Mäusemilzzellen 48 Stunden nach Mitogenkontakt publizierten Harris und Olsen (1976). In Gegenwart von Ovalicin findet man ebenfalls eine zeitliche Zunahme der markierten Zellen, allerdings mit verringerter Geschwindigkeit. Nach 7 Stunden bleibt der Anteil markierter Zellen konstant (Fig. 13b). Dies wird möglicherweise dadurch hervorgerufen, daß sich Lymphozyten nach rund 50 stündiger Ovalicineinwirkung nicht mehr teilen können. Die verlangsamte Zunahme der Zahl markierter Zellen in der Kultur ohne Ovalicin bei längeren [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidinpulsen dürfte dann auf markierte Tochterzellen zurückzuführen sein, die bereits in der Elternzelle radioaktiv markierte DNA mitbringen können. Gestützt wird diese Deutungsmöglichkeit durch folgenden Versuch:

Bestimmt man zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Stimulation

Fig. 13 Einfluß von Ovalicin auf den Thymidineinbau in das säureunlösliche Zellysat stimulierter Lymphozyten und die Thymidinaufnahme einzelner Zellen

Nach 8 stündiger Vorinkubation wurden  $100 \times 10^6$  Zellen wie in Tab. 4 beschrieben, stimuliert. Ein Ansatz erhielt mit dem Mitogen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. 39 h später werden 0.9 ml Proben in kleine Kulturröhrchen gefüllt (s. Methode 7a) und mit [ $^3\text{H}$ ]Thymidin (0.25  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 0.06 Ci/mMol) bzw. mit [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin (0.25  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 0.06 Ci/mMol) versetzt (s. Methode 7c). Nach den in der Abszisse angegebenen Zeiten wurde der [ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbau in säureunlösliches Zellysat (a) bestimmt (s. Methode 8aß, 10a) und die [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin markierten Zellen für die Autoradiographie präpariert (s. Methode 11ba). Nach einer Expositionsdauer von 32 h wurde der Anteil markierter Zellen (b) ermittelt (s. Methode 11bδ).

c) Es wurden die aus (a) bzw. (b) errechnete Hemmung des [ $^3\text{H}$ ]Thymidin- (▲) bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidineinbaus (■) aufgetragen.

○ - Ovalicin

● + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

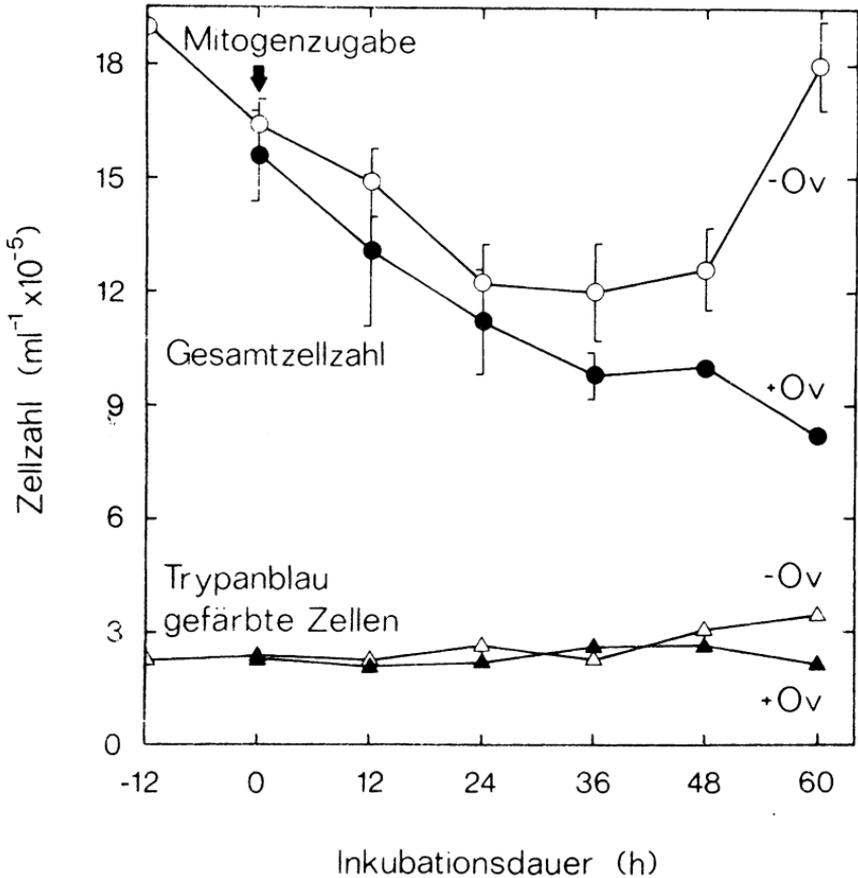


Fig. 14 Einfluß von Ovalicin auf die Vitalität von Lymphozyten

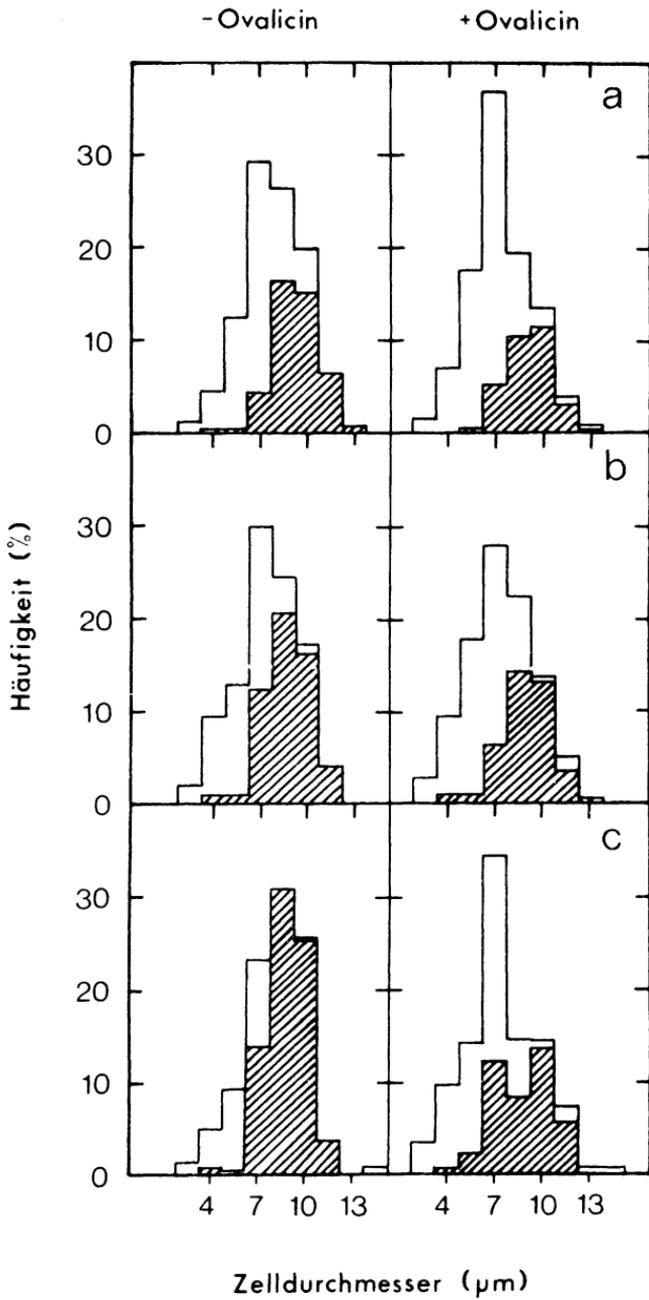
Kulturbedingungen wie in Fig. 40 beschrieben. Zu den angegebenen Zeiten wurden den stimulierten Lymphozytensuspensionen mit und ohne Ovalicin 0.5 ml Proben ( $t = 60$ : 2 Proben von je 0.5 ml) entnommen und die Zahl der Zellen/ml und der Anteil mit Trypanblau anfärbbaren Zellen bestimmt (s. Methode 5). Die Bestimmung der Zellzahl wurde pro Probe 2 - 6 mal durchgeführt.

von Lymphozyten die Zahl der Zellen pro ml, so findet man eine stetige Abnahme der Zelldichte. 36 Stunden nach Mitogenzu-

gabe sind ungefähr 75 % der bei Versuchsbeginn ( $t = 0$ ) vorhandenen Zelldichte erreicht. Ab 48 Stunden nach Mitogenzusatz steigt die Zelldichte jedoch wieder an und überschreitet 12 Stunden später die ursprünglich ( $t = 0$ ) vorhandene Zellkonzentration. In Gegenwart von Ovalicin fällt die Zellzahl bei einem fast gleich großen Anteil Trypanblau-anfärbbarer Zellen nur geringfügig rascher ab als bei den Kontrollzellen. Diese Abnahme der Zellzahl setzt sich auch über die 48. Stunde nach Versuchsbeginn fort (Fig. 14). Es bleibt also die bei den Lymphozyten ohne Ovalicin beobachtete Zellvermehrung aus (vgl. dazu auch Gerhart et al., 1976).

Aus den weiter oben beschriebenen Markierungskinetiken der Lymphozyten mit und ohne Ovalicin (Fig. 13) kann man ersehen, daß Ovalicin, wie in dem in Tab. 5 dargestellten Versuch die Bildung markierter Zellen hemmt. Diese Hemmung nimmt, wie die Reduktion des Thymidineinbaus in säurefällbares Material mit der Zeit zu (Fig. 13c), ist im Durchschnitt jedoch nur halb so groß (Fig. 13c).

Nach Mitogenkontakt findet vor Eintritt der aktivierten Lymphozyten in die S-Phase eine Differenzierung des kleinen Lymphozyten zur größeren Blastzelle statt (Ling und Kay, 1975; Janossy, 1972; Moerman et al., 1977). Dies läßt sich auch zeigen, wenn man die Zellen des oben dargestellten Versuchs - markiert oder unmarkiert - nach ihrer Größe ordnet und ihre jeweilige Häufigkeit aufträgt. Man findet wie auch bei Phytohämagglutinin stimulierten peripheren Blutlymphozyten von Mensch und Kanninchen (Knight, 1965) eine bevorzugte Markierung der größten Lymphozyten (Fig. 15), die sich allerdings nach längeren Pulsen zu Gunsten kleinerer Zellen verschiebt (Fig. 15, - Ovalicin). Daraus kann man schließen, daß kleinere Zellen Thymidin langsamer einbauen als große Zellen. Dies wird durch Bestimmung der mittleren Markierungsintensität einzelner Größenklassen bestätigt. Über kleinen Zellen findet man nach Autoradiographie im Durchschnitt eine geringere Anzahl von Silberkörnern als bei großen (ohne Beleg). Dieser Befund weist auf Lymphozytensubpopulationen hin, die sich nach



Größe und S-Phaselänge unterscheiden. Bei den kleineren, im Durchschnitt geringer markierten Zellen könnte es sich jedoch auch um Tochterzellen handeln, die nach erfolgter Mitose sich mit dem Genmaterial auch die in die DNA der Mutterzelle inkorporierte Radioaktivität teilen.

Ovalicin gehemmte Milzlymphozyten bilden fast im gleichen Maße wie Kontrollzellen Blastzellen nach Con A-Stimulation (vgl. Abschnitt B1b und C4). Fallen nun bestimmte Größenklassen markierter Zellen völlig aus? Dies ist nicht der Fall. [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin-inkorporierende Lymphozyten zeigen nach rund 48 stündiger Ovalicineinwirkung eine ähnliche Größenverteilung wie die markierten Zellen ungehemmter Lymphozyten (Fig. 15). Im Gegensatz zu ungehemmten Zellen bleibt jedoch die Verteilung der markierten Zellen über die verschiedenen Größenklassen trotz zunehmender Pulslänge weitgehend gleich (Fig. 15a-c). Dies hat zur Folge, daß die Bildung der kleinen markierten Zellen stärker gehemmt wird (Fig. 15a-c), da in ungehemmten Kulturen mit längeren Pulsen zunehmend kleinere Lymphozyten markiert werden.

Aus diesen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Eindeutig kann man als Ursache eine generelle Verlangsamung der S-Phase ausschließen, da die Hemmung der mittleren Zellmarkierung nur gering durch Ovalicin erniedrigt wird, zum anderen die Zahl der markierten Zellen in Gegenwart des Toxins deutlich vermindert ist. Auf der anderen Seite kann die Hem-

Fig. 15 Einfluß von Ovalicin auf die Häufigkeitsverteilung des Durchmessers unmarkierter und [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin markierter Lymphozyten

Stimulation, Markierung und Autoradiographie der Zellen erfolgte wie in Fig. 13 beschrieben. Der Durchmesser der Milzzellen wurde wie in Methode 16b beschrieben ermittelt.

[ $^{14}\text{C}$ ]Thymidinpulse: 2 h (a), 6 h (b) und 13,5 h (c)

schraffierte Fläche: markierte Zellen

unschraffierte Fläche: markierte und unmarkierte Zellen

mung nicht ausschließlich auf die Ausschaltung einer sensitiven Subpopulation bei völliger Schonung der übrigen Subklassen zurückgeführt werden. Die gleichzeitige Reduktion der Anzahl markierter Zellen und im geringeren Maße der Markierungsintensität sprechen eher für eine Verlängerung der Zellzyklusphasen. Dadurch treten innerhalb eines bestimmten Zeitraums weniger Zellen in die S-Pase ein, während der die Zellen pro Zeiteinheit weniger Radioaktivität inkorporieren. Die Ergebnisse lassen allerdings keine Aussage darüber zu, ob von der Ausdehnung des Zellzyklus alle Zellen, oder nur Lymphozyten einer bestimmten Subklasse betroffen sind. Es ist jedoch auch möglich, daß die resistente Subpopulation von vornherein einen längeren Zellzyklus aufweist.

c) Unterscheiden sich Lymphom- und Myelomzellen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ovalicin?

Die in den voran gegangenen Abschnitten beschriebenen Versuche ergaben Hinweise auf eine besondere Empfindlichkeit einzelner Lymphozytensubpopulationen. Welche Subpopulationen kommen dafür in Frage?

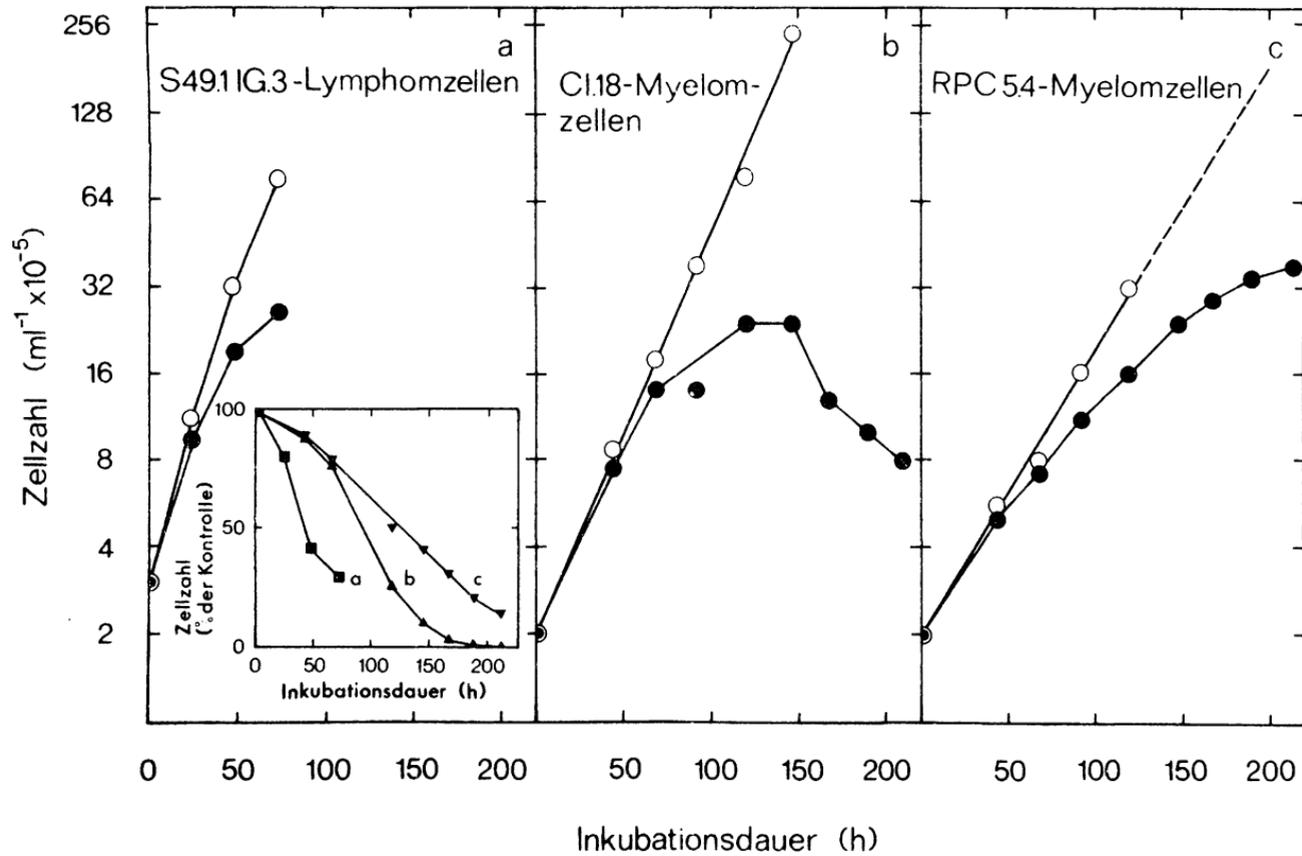
Lymphozyten können anhand von Oberflächenantigenen in zwei Hauptgruppen unterteilt werden:

T-Zellen - mit einem Anteil von 30 - 35 % (Raff und Owen, 1971) - mit dem zellspezifischen Protein $\theta$  auf der Zelloberfläche und B-Zellen, die ungefähr 50 - 55 % aller Milzzellen ausmachen, mit Immunglobulinmolekülen als Oberflächenmarker (Janossy et al., 1973). Die T-Zellen setzen sich aus mehreren Untergruppen zusammen, die durch Funktion und weitere Oberflächenantigene charakterisiert sind (Frelinger, 1977).

Von beiden Hauptgruppen gibt es eine Anzahl permanenter Zelllinien aus Mäusen, die zumindest einige für ihre Gruppe charakteristische Eigenschaften trotz 'Transformation' behalten haben. Die von Horibata und Harris (1970) beschriebenen Lymphomalinien ähneln in ihrer Sensitivität gegenüber Glukocorticoiden unreifen Thymozyten (Claman, 1972). Wie stimulierte B-Zellen (Plasmablastzellen) haben viele Myelomlinien die

Fähigkeit zur Produktion und Sekretion von Antikörpern oder zumindest von Untereinheiten beibehalten. Sie sind weit weniger empfindlich gegenüber Hydrocortison (Horibata und Harris, 1970), was auch für Plasmazellen beschrieben wird (Trowell, 1958). Es erscheint also sinnvoll diese monoklonalen lymphoiden Zellen als angenähertes Modell für reine Lymphozytensubpopulationen zur Untersuchung biochemischer Eigenschaften einzusetzen.

U. Gehring (1977) untersuchte, auf unseren Vorschlag hin, die Wirkung von Ovalicin auf eine Lymphoma- (S49.1 IG3) und 2 Myelomalinien (Cl.18; RPC5.4) aus Mäusen. S49.1 IG3 ist ein Subklon der S49.1-Lymphomlinie, die bereits in Kapitel A1 beschrieben wurde. Die Myelomlinie Cl.18 stammt von C3H-Mäusen (Horibata und Harris, 1970), RPC5.4-Myelomzellen von Balb/c-Mäusen (U. Gehring, persönliche Mitteilung); beide produzieren IgG 2a-Antikörper (U. Gehring, persönliche Mitteilung). Als Meßparameter zur Bestimmung der Zellproliferation diente die Zellzahl. In den Kontrollkulturen vermehrten sich die Zellen annähernd exponentiell mit unterschiedlicher Generationszeit. S49.1 IG3-Lymphomzellen verdoppeln sich innerhalb von ca. 15 Stunden, Cl.18-Myelomzellen innerhalb von 20 Stunden. Die Längen beider Zellzyklen stimmen mit den von Horibata und Harris (1970) ermittelten Werten gut überein (16 bzw. 20 Stunden). Der Zellzyklus von RPC5.4-Myelomzellen dauert rund 30 Stunden (Fig. 16). In Gegenwart von  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin können die Zellen aller 3 Linien 2 - 3 Zellzyklen ungehindert durchlaufen, bis eine Reduktion der Zellzahl sicher meßbar wird (Fig. 16a,b,c). 50 % Hemmung der Zellzahl werden für S49.1 IG3-Lymphomzellen nach rund 45 Stunden, für Cl.18-Myelomzellen nach 95 Stunden und für RPC5.4-Myelomzellen nach ungefähr 125 Stunden erreicht (inset Fig. 16a). Nach längerer Einwirkungsdauer setzen Vermehrungshemmung und Zelltod ein (Fig. 16b,c). Die Dosisabhängigkeit der Ovalicinhemmung wurde an S49.1 IG3- und RPC5.4-Zellen untersucht. Die Zellvermehrung der S49.1 IG3-Lymphomlinie wird nach 3 tägiger Toxinwirkung bei ähnlich niedrigen Ovalicindosen gehemmt, wie



der Thymidineinbau in Mäusemilzzellen, S49.1-, 3T6- und HeLa-Zellen (Fig. 6, 8). Nach gleich langer Einwirkung von niedrigen Ovalicinkonzentrationen bleibt dagegen die Myelomalinie unbeeinflusst. Erst bei hohen Dosen (größer  $2 \times 10^{-6}$  M) tritt ein wahrscheinlich unspezifischer Effekt auf (Fig. 17), der schon bei Milzzellen beobachtet wurde (Fig. 6).

Erstaunlich ist die langsame Ausprägung der Wachstumshemmung durch Ovalicin bei allen 3 untersuchten lymphoiden Zelllinien. Die T-Lymphomzellen werden jedoch deutlich rascher gehemmt als beide Myelomalinien. Dies könnte auf eine größere Empfindlichkeit von Lymphozytensubpopulationen der T-Reihe hinweisen. Berücksichtigt man allerdings die Zykluslängen der einzelnen Zelllinien, so fällt auf, daß Resistenz (Fig. 16) und Zellzyklusdauer (S. 75) positiv miteinander korrelieren. Erst nach Untersuchung einer größeren Palette von Lymphom- und Myelomlinien (besonders von Lymphomalinien mit langer und Myelomalinien mit kurzer Verdopplungsdauer) wird es möglich sein zu entscheiden, ob S49.1 IG3-Zellen aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu T-Lymphomlinien, oder wegen ihres kurzen Zellzyklus rascher gehemmt werden.

Zusammenfassend läßt sich über die in Abschnitt 3 dargestellten Versuche sagen:

Fig. 16 Wirkung von Ovalicin auf die Zellvermehrung von S49.1 IG3-Lymphomzellen und Cl.18- und RPC5.4-Myelomzellen

Nach Gehring, 1977 (persönliche Mitteilung): Exponentiell wachsende Zellen erhielten  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin. Zu den angegebenen Zeiten wurden den Kulturen mit und ohne Hemmstoff Proben entnommen und mit dem Hämozytometer die Zellzahl pro ml bestimmt. Durch Verdünnen mit frischem Medium wurde die Zellkonzentration zu verschiedenen Zeiten immer wieder neu eingestellt, sodaß die Zelldichte nicht über  $1.5 - 2.0 \times 10^6$  Zellen/ml anstieg.

- a) S49.1 IG3-Lymphomzellen
- b) Cl.18-Myelomzellen
- c) RPC5.4-Myelomzellen

Inset (a): Kinetik der Wachstumshemmung durch Ovalicin. Zur Berechnung wurden die Wachstumskurven der Kontrollzellen extrapoliert.

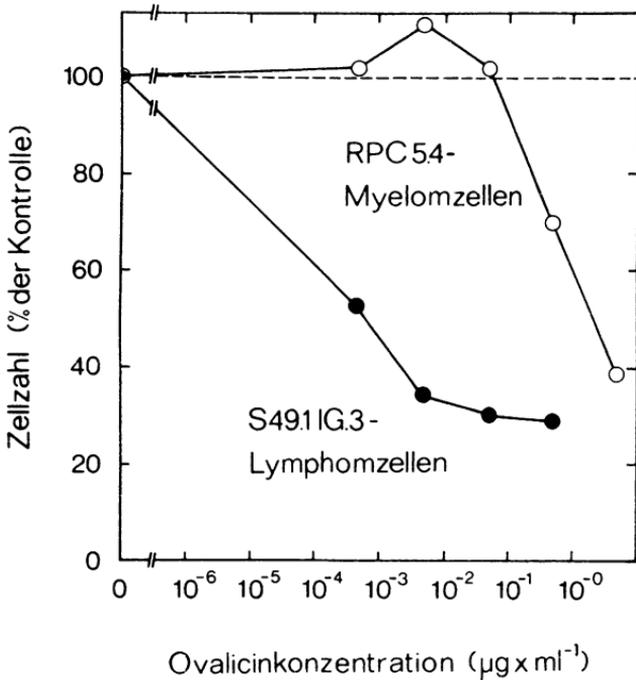


Fig. 17 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Ovalicin auf die Zellvermehrung von S49.1 IG3-Lymphom- und RPC5.4-Myelomzellen

Nach Gehring, 1977 (persönliche Mitteilung): Exponentiell wachsende Zellen erhielten verschiedene Konzentrationen Ovalicin. Nach 72 h (S49.1 IG3-Zellen) bzw. 67 h (RPC5.4-Zellen) wurden den Kontrollkulturen und den Kulturen mit Ovalicin Proben entnommen und die Zellkonzentration bestimmt.

100 % Zelldichte: S49.1 IG3-Zellen  $7.6 \times 10^6/\text{ml}$   
RPC5.4-Zellen  $1.6 \times 10^6/\text{ml}$

Bei dem auffälligen Phänomen der nicht durch Ovalicin hemmbaren DNA-Synthese handelt es sich wahrscheinlich um normale Replikation, die nicht durch gleichmäßige Reduktion der DNA-Syntheseleistung aller in der S-Phase befindlichen Lymphozyten bedingt ist. Weiter legen die autoradiographischen Ver-

suche nahe, daß nicht der Totalausfall einer sensitiven Subpopulation die Ursache für die Restsynthese sein kann. Es scheint vielmehr, daß Zellzyklusphasen verlangsamt werden. Möglicherweise sind einzelne Lymphozytensubpopulationen verschieden stark betroffen.

## B Ovalicinwirkung und Zellzyklus

### 1. Ovalicinwirkung und 'Zellzyklus' von Mäusemilzzellen

#### a) Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin auf den Thymidineinbau zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Zugabe

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, daß Ovalicin ein äußerst wirksamer Hemmstoff für das Wachstum eukariotischer Zellen ist. Präferentiell werden lymphoide Zellen (Ausnahme: Myelomazellen?) gehemmt, möglicherweise nur bestimmte Subpopulationen von Milzzellen.

Was ist nun die biochemische Grundlage dieser Selektivität? Zur Begrenzung einer Vielzahl potentiell möglicher Wirkorte, wäre es wichtig zu wissen, ob Ovalicin zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus seine Wirkung entfalten kann, oder nur während einer bestimmten Zeit des Zellzyklus in Reaktionen der Zelle eingreift.

Weiner (1976) fand, daß Ovalicin auf den zwischen der 25. und 36. Stunde nach Con A-Stimulation gemessenen [ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbau in Mäusemilzzellen nur dann maximal wirkt, wenn es zwischen der 6. und 20. Stunde im Medium anwesend ist. Gleichlange Ovalicinpulse (14 Stunden) zu späteren Zeiten nach Mitogenzugabe sind weit weniger wirksam (Weiner, 1976). Auch mit Lipopolysaccharid aus E. coli stimulierte Milzzellen und Con A-stimulierte, Hydrocortison-resistente Thymozyten zeigen eine Ovalicin sensitive Phase. Wird Ovalicin 12 - 24 Stunden nach Mitogen zugesetzt, kann der Thymidineinbau in das säureunlösliche Zellsat von Lymphozyten zwischen der 36. und 60. Stunde nicht mehr oder nur noch schwach gehemmt werden (Weiner, 1976). Die in diesen Versuchen zur Bestimmung der DNA-Syntheseaktivität angewandten [ $^3\text{H}$ ]Thymidinpulse waren zu lang (6 - 24 Stunden) und die spezifische Radioaktivität des radioaktiven DNA-Vorläufers zu hoch (2 bzw. 6 Ci/mMol; dies entspricht bei 1  $\mu\text{Ci/ml}$  einer Thymidinkonzentration von 0.5  $\mu\text{M}$  bzw. 0.15  $\mu\text{M}$ ; vgl. dazu Kap. A3a) um die Zellproliferation quantitativ zu erfassen (Janossy et al., 1972; vgl. Fig. 10a).

In den folgenden Experimenten wurde daher in 1 - 2 stündigen [ $^3\text{H}$ ]Thymidinpulsen (spezifische Radioaktivität: 0.5 Ci/mMol; dies entspricht bei 1  $\mu\text{Ci/ml}$  einer Thymidinkonzentration von 2  $\mu\text{M}$ ) zu verschiedenen Zeiten nach Mitogen Zugabe die Reduk-

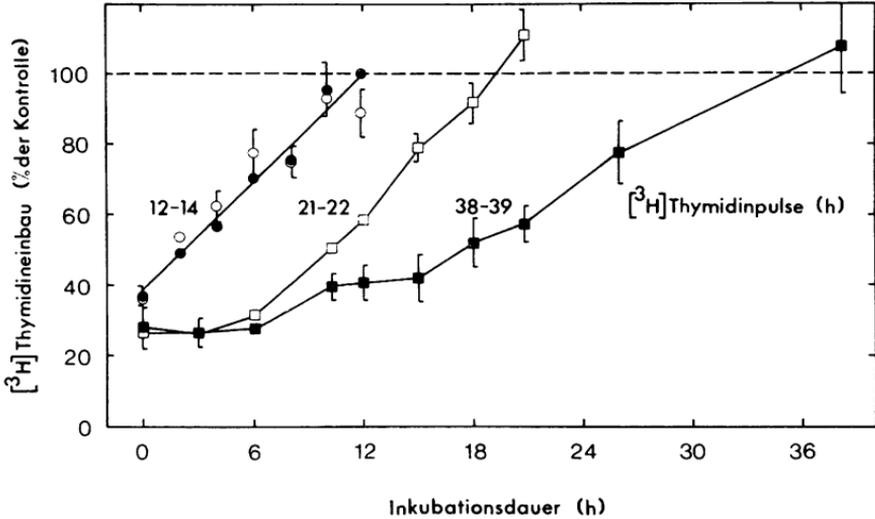


Fig. 18 Wirkung von Ovalicin auf den Thymidineinbau stimulierter Lymphozyten in Abhängigkeit seines Zugabezeitpunktes nach Con A

Jeweils  $8.8 \times 10^6$  Zellen erhielten nach 10 (■, □) bzw. 12 stündiger (○, ●) Vorinkubation Con A (Endkonzentration: 1  $\mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) (s. Methode 4a $\beta$ ). Zu den in der Abszisse angegebenen Zeiten wurde in 20  $\mu\text{l}$  BSS Ovalicin (resultierende Konzentrationen:  $2 \times 10^{-7}$  M ●, □, ■;  $3 \times 10^{-9}$  M ○) zugesetzt (s. Methode 7a). Die Kontrollkulturen erhielten 20  $\mu\text{l}$  BSS (□, ■ jedoch nur t = 0, 12, 21 h bzw. t = 0, 12, 21 und 38 h). 12 h (○, ●) bzw. 21 h (□) und 38 (■) nach Mitogenzugabe wurden je Flasche 2 x 0.9 ml Zellsuspension (Proben für Pulse zur 21. und 38. h stammen aus jeweils 1 Flasche) entnommen (s. Methode 7a) und für 1 h (▲, ■) bzw. 2 h (○, ●) [ $^3\text{H}$ ]Thymidin angeboten (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 0.5 Ci/mMol; s. Methode 8a $\beta$ ) und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode 10a). Zur Berechnung der Restaktivität wurden entweder die entsprechenden Kontrollwerte (●, ○) oder der Mittelwert der Kontrollwerte (▲, ■) herangezogen (s. Methode 21).

100  $\beta$ -Werte:

(in ( ) = Zahl der Wertepaare)	○	1 558 ± 159	IpM (7)
	●	1 042 ± 44	IpM (7)
	▲	5 755 ± 234	IpM (3)
	■	34 697 ± 3 164	IpM (4)

Tab. 6 Wirksamkeit von 12 und 24 stündigen Ovalicinpulsen auf den Thymidineinbau Con A-stimulierter Lymphozyten

Zeitraum des Ovalicinpulses (h nach Con A-Zugabe)	Zeitraum des [ <sup>3</sup> H]Thymidinpulses (h nach Con A-Zugabe)	[ <sup>3</sup> H]Thymidineinbau (IpM)	Hemmung (%)
0 - 12 -	12 - 13	163 + 6 383 ± 22	68
12 - 24 -	24 - 25	2 836 ± 76 5 089 ± 1 <sup>1)</sup>	45
24 - 36 -	36 - 37	11 773 ± 73 18 460 ± 403 <sup>2)</sup>	36
36 - 48 -	48 - 49	23 774 ± 95 35 272 ± 85 <sup>3)</sup>	33
0 - 24 -	24 - 25	1 510 ± 7 5 266 ± 280 <sup>1)</sup>	72
12 - 36 -	36 - 37	7 525 ± 112 17 371 ± 56 <sup>2)</sup>	57
24 - 48 -	48 - 49	15 838 ± 137 37 399 ± 153 <sup>3)</sup>	58
36 - 60 -	60 - 61	25 736 ± 635 51 398 ± 474	50

Tab. 6 Wirksamkeit von 12 und 24 stündigen Ovalicinpulsen auf den Thymidineinbau Con A stimulierter Lymphozyten

Jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden nach 15 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoethanol aktiviert (s. Methode 4a $\beta$ ). Zu den angegebenen Zeiten wurde Ovalicin in 25  $\mu$ l BSS (s. Material 3a) zu einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M zugesetzt. Die Kontrollen erhielten das gleich Volumen BSS ohne Hemmstoff. 12 bzw. 24 h nach Hemmstoffzugabe wurde den Flaschen je  $2 \times 0.9$  ml Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a), den Zellen für 1 h [ $^3$ H]Thymidin (1  $\mu$ Ci/ml; 0.5 Ci/mMol) angeboten (s. Methode 7c) und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

Für die Unbedenklichkeit der Volumenveringerung durch Probenentnahme (vgl. Methode 7a):

Die in Teil 2 der Tabelle aufgeführten Proben enthielten ab 12 h vor [ $^3$ H]Thymidin-Pulsbeginn nur noch die Hälfte der Zellsuspension (2 ml statt 4ml), da zu diesem Zeitpunkt die Proben für Teil 1 der Tabelle entnommen wurden. Es müssen die die Wertepaare mit jeweils gleicher Nummer) verglichen werden.

tion des Thymidineinbaus durch Ovalicin bei unterschiedlich langer Einwirkung untersucht.

Parallel angesetzte Milzzellkulturen erhielten zu unterschiedlichen Zeiten nach Con A-Zugabe  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin, das bis zum Versuchsende im Medium blieb. Als Kontrollen dienen Parallelansätze, die identisch behandelt wurden, jedoch wurde statt der Ovalicinlösung das gleiche Volumen BSS (s. Material 3a) zugesetzt. Nach unterschiedlich langer Kulturdauer wurden den Zellsuspensionen Aliquots entnommen und in 1 Stunden Pulsen (mit Ausnahme der frühesten Pulse: 2 Stunden) der Thymidineinbau der Lymphozyten bestimmt.

Diese Versuche zeigen, daß Ovalicin nicht sofort auf den Thymidineinbau von Lymphozyten wirkt. Vielmehr ist eine mindestens 12 - 14 stündige Einwirkung nötig, um den Thymidineinbau der Zellen maximal zu unterdrücken (Fig. 18). Diese Ergebnisse entsprechen zumindest qualitativ den Befunden von Weiner (1976). Allerdings beobachtete sie in den meisten Versuchen keinerlei Reduktion des Thymidineinbaus mehr, wenn Ovalicin nach einem kritischen Zeitpunkt ( $t = 12 - 24$ ) zugesetzt wur-

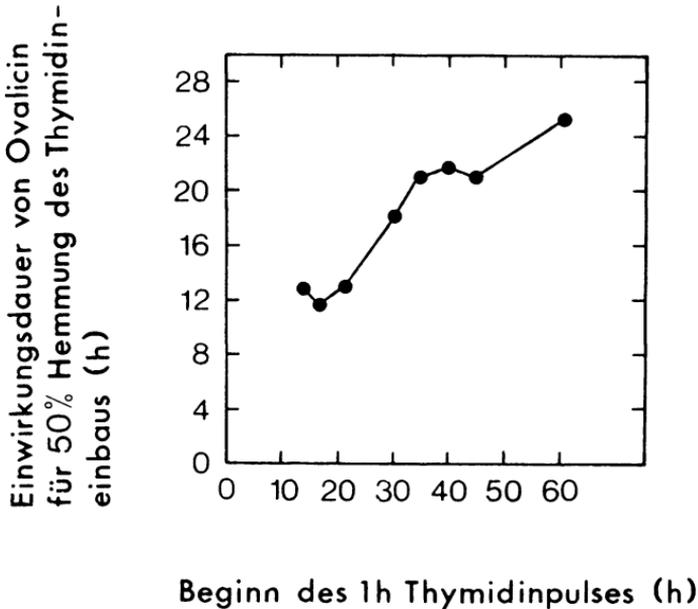


Fig. 19 Einwirkungsdauer von Ovalicin für 50 % Hemmung der DNA-Synthese stimulierter Lymphozyten in Abhängigkeit vom Meßzeitpunkt des Thymidineinbaus

Aus wie in Fig. 18 und Tab. 6 dargestellten Versuchen wurden die Werte dieser Figur wie folgt erhalten:

Die Wertepaare 'Hemmung des Thymidineinbaus (%) / Beginn eines 1 h  $^{[3]H}$  Thymidinpulses (h nach Con A-Zugabe)' wurden in Gruppen gleicher Ovalicinzugabe-Zeitpunkte nach Stimulation geordnet und die Hemmung als Funktion des Pulsbeginns aufgetragen. Durch Interpolation der verschiedenen Kurven wurden die Pulszeitpunkte für 50 % Hemmung des Thymidineinbaus und die dazu nötige Einwirkdauer von Ovalicin erhalten.

Beispiel: Mißt man den Thymidineinbau zwischen der 60. und 61. h nach Con A-Zugabe, so muß man Ovalicin ca. 25 h vor Pulsende Ovalicin zusetzen, um eine 50 % Hemmung des Thymidineinbaus erzielen zu können.

de. Diese von unseren Beobachtungen abweichenden Befunde können durch abweichende Kultur- und Pulsbedingungen verursacht sein (vgl. Anhang). Die zur maximalen Hemmung benötigte Toxin-einwirkdauer verlängert sich um so mehr, je später man nach

Con A-Zugabe die DNA-Synthese der proliferierenden Lymphozyten mißt (Fig. 10), d.h. Ovalicinpulse bestimmter Länge werden mit fortschreitender Kulturdauer immer unwirksamer (Tab. 6; s. auch Weiner, 1976). Um z.B. den Thymidineinbau der zwischen der 50. und 61. Stunde nach Con A-Zugabe in der S-Phase befindlichen (und in die S-Phase eintretenden) Lymphozyten zu 50 % zu hemmen, muß Ovalicin vor Pulsbeginn mindestens 24 Stunden einwirken; mißt man dagegen zur 24. Stunde, so genügen bereits 12 Stunden zur 50 % Reduktion des Thymidineinbaus (Fig. 19). Weiter sieht man, daß für die Ovalicinwirkung die ersten 6 Stunden nach Mitogenstimulation, zumindest für den nach der 20. Stunde gemessenen Thymidineinbau, nicht wichtig sind (Fig. 18; s. auch Weiner, 1976).

Zur Interpretation dieser Ergebnisse sollte man sich der komplexen Vorgänge bewußt sein, die in einer Milzzellkultur nach Mitogenzusatz ablaufen. Wie schon in Kapitel A5 beschrieben, erfolgt die Stimulation durch polyklonale Mitogene (wie z.B. Con A) weitgehend asynchron. Lymphozyten zeigen unabhängig von Mitogen und Zusammensetzung des Zellgemischs eine erstaunliche Variabilität in der Länge ihrer ersten  $G_1$ -Phase. Im Mittel ist die  $G_1$ -Phase vor der ersten Teilung bedeutend länger als bei den folgenden Teilungen (Iing und Kay, 1975). Die Länge der 3 +  $G_2$ -Phase von Phytohemagglutinin-stimulierten menschlichen Blutlymphozyten ist dagegen unabhängig von der Anzahl der nach Mitogenkontakt durchlaufenen Generationen (Steffen und Stolzmann, 1969). Auch der Zeitpunkt der Stimulation einzelner Lymphozyten scheint sich über einen längeren Zeitraum zu erstrecken. Gunther et al. (1974) fanden bei kompetitiver Verdrängung des mitogenen Liganden Con A von der Zelloberfläche durch  $\alpha$ -Methylmannosid, daß das Lektin für optimale Stimulation von Mäusemilzzellen (gemessen an [ $^3H$ ]Thymidineinbau zur 48. Stunde) 18 - 20 Stunden einwirken muß. Durch Abfangen von Con A durch Anti-Con A-Immunglobulin wird der Thymidineinbau selbst noch 2 Tage nach Mitogenzusatz beeinflusst (Jones, 1975). Als weitere Komplikation kommt hinzu, daß vor Abschluß des Eintritts aller direkt stimulierbarer Lymphozyten

in den ersten Zellzyklus bereits die ersten Tochterzellen erscheinen, die durch Teilung der Schnellläufer entstanden sind. Dies erwartet man bei einer Verdopplungsdauer Mitogen-stimulierter Lymphozyten nach dem ersten Zellzyklus von 12 - 14 Stunden (Gerhart et al., 1976; Lohrmann et al., 1974). Man muß also damit rechnen, daß die DNA-Synthese zur 36. Stunde nach Con A-Zugabe im Mäusemilzzellen-System schon zu einem signifikanten Anteil von Zellen in der zweiten S-Phase bestritten wird, da man bereits 12 Stunden vorher einen erheblichen Thymidineinbau beobachtet (Fig. 35). Gerhart et al. (1976) finden z. B. einen zweimaligen S-Phasendurchgang bei Thymozyten zwischen 40 und 65 Stunden nach Con A-Stimulation. Zusätzlich können sekundär, z. B. über lösliche Faktoren, Lymphozytensubpopulationen (B-Zellen) durch Con A aktiviert werden (Andersson et al., 1972), die eine Zellzykluslänge von 18 Stunden aufweisen (Andersson et al., 1977). Folglich erfaßt man zu verschiedenen Zeiten nach Mitogenzugabe in kurzen Thymidinpulsen völlig unerschiedlich zusammengesetzte Populationen von Lymphozyten: Zu frühen Zeiten nach Mitogenzusatz dürften weitgehend synchron stimulierte Populationen in der ersten S-Phase gemessen werden, während später neben spät stimulierten Lymphozyten bzw. Zellen mit langer  $G_1$ -Phase bereits Tochterzellen mit erfaßt werden. Mit weiter fortschreitender Kulturdauer erwartet man Thymidineinbau durch Populationen, die nur noch aus Tochterzellen bestehen. Darüberhinaus können die zu verschiedenen Zeiten nach Mitogenzusatz in S-Phase befindlichen Zellen in ihrer Subpopulationszusammensetzung variieren. Wie lassen sich nun die oben beschriebenen Ergebnisse interpretieren? Es gibt wenigstens 3 Erklärungsmöglichkeiten:

i) Ovalicin muß, unabhängig vom Meßzeitpunkt, vor dem Beginn der S-Phase über einen längeren Zeitraum (12 - 14 Stunden) während der  $G_1$ -Phase<sup>+</sup>) einwirken. Die mit der Zeit zunehmende

---

+ ) Weiter ist ein ausschließlicher Angriff von Ovalicin während der S- oder  $G_2$ -Phase unwahrscheinlich, da einmal die laufende DNA-Synthese praktisch nicht beeinflusst und bereits die erste S-Phase gehemmt wird.

Asynchronie der Stimulation könnte die Ursache für die steigende Unschärfe der Ovalicinhemmung sein. Zu späteren Meßzeitpunkten werden Zellen mit langer  $G_1$ -Phase erfaßt, die eine längere Ovalicineinwirkung für maximale Hemmung benötigen.

Diese Abnahme der Ovalicinempfindlichkeit kann auch durch das Auftreten von Tochterzellen bedingt sein, die sich möglicherweise nicht nur in ihrer Zellzykluslänge, sondern sich auch durch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Ovalicin von den Elternzellen unterscheiden.

Eine ähnliche Zunahme der Ovalicinresistenz würde man bei Hemmung des  $G_0$ (=Ruhephase)/ $G_1$ -Übergangs erwarten, da mit fortschreitender Zeit der Übertritt von der  $G_0$ -Phase in die  $G_1$ -Phase bei immer weniger Zellen stattfindet.

ii) Die zunehmende Resistenz der Zellen kann auch durch das Auftreten von weniger Ovalicin empfindlichen Subpopulationen verursacht sein.

iii) Als weitere Erklärung ist denkbar, daß Ovalicin nur langsam in die Zellen eindringt oder zuerst metabolisch aktiviert werden muß. Beide Prozesse dauern mindestens 12 - 14 Stunden. Zu späteren Zeiten nach Lektinzugabe ist diese Zeitdauer verlängert. Untersuchungen zu diesem Problem (s. Abschnitt B2b) machen diese Erklärung jedoch wenig wahrscheinlich.

Es ist möglich, daß Kombinationen der angeführten Interpretationen zutreffen.

#### b) Beeinflussung der Zellvolumenzunahme nach Con A-Stimulation

Ein auffälliges Merkmal für erfolgreiche Stimulation von Lymphozyten durch polyklonale Pflanzenmitogene ist das dramatische Anwachsen ihres Zellvolumens (= Blastzellbildung) (Ling und Kay, 1975). Vom Volumenzuwachs sind Kern und Zytoplasma betroffen (eigene Beobachtungen; Schläger, 1978; Janossy et al., 1972). Der Anteil Blastzellen korreliert gut mit dem zur gleichen Zeit bestimmten Thymidineinbau (Gunther et al., 1974), da Blastzellbildung eine Voraussetzung für DNA-Synthese zu sein scheint (Moerman et al., 1977). Man sollte daher erwarten, daß die Vergrößerung des Zellvolumens während der  $G_1$ -Pha-

se stattfindet. Tatsächlich finden Andersson und Melchers (1974) trotz Hemmung der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff Bildung von Plasmablast-ähnlichen Zellen bei nu/nu Mäusemilzzellen (congenital athymischer Mäusestamm) 25 Stunden nach Lipopolysaccharid-Stimulation im gleichen Ausmaß wie in Kontrollkulturen (s. auch Janossy et al., 1976; Salzman et al., 1966). Beeinflusst nun Ovalicin diese frühen, zeitlich mit der G<sub>1</sub>-Phase verknüpften Vorgänge der Lymphozytentransformation? Das Auftreten großer Zellen<sup>+</sup> wird durch Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M mit Mitogen zugesetzt) selbst bei 48 stündiger Einwirkung nicht verhindert. Der Anteil Blastzellen an der Gesamtzellzahl bzw. der mittlere Durchmesser aller Zellen (Hartmann et al., 1978) wird im Vergleich zu ungehemmten Milzzellen 24 - 48 Stunden nach Ovalicinzugabe nur um 15 - 25 % reduziert. Der parallel dazu bestimmte Thymidineinbau wird dagegen zu ca. 70 - 90 % gehemmt (Hartmann et al., 1978; Fig. 36). Deshalb findet man nach Autoradiographie Ovalicin-gehemmter Lymphozyten, die mit [<sup>14</sup>C]Thymidin markiert wurden, - besonders nach fortgeschrittener Kulturdauer bzw. bei längeren [<sup>14</sup>C]Thymidinpulsen - im Vergleich zu den Kontrollzellen vermehrt unmarkierte Blastzellen (Fig. 15). Dieser Befund ist in Fig. 20 noch einmal auf andere Weise dargestellt. Es wurde hierbei über den Durchmesser aller markierten bzw. unmarkierten Zellen gemittelt. Man erkennt, daß - wie schon aus Fig. 15 ersichtlich - markierte Zellen im Durchschnitt deutlich größer sind als unmarkierte Zellen. Bildet man den Mittelwert aus den Durchmessern aller unmarkierten, Ovalicin-gehemmten Zellen, so liegt dieser signifikant über dem der Zellen ohne Toxin. Markierte Zellen haben dagegen mit und ohne Hemmstoff praktisch den gleichen mittleren Durchmesser (Fig. 20).

---

<sup>+</sup>) Lymphozyten mit einem Durchmesser  $\geq 8 \mu\text{m}$  werden definitionsgemäß als Blastzellen bezeichnet, da diese Größenklasse in frisch isolierten Milzzellen praktisch nicht vorhanden ist (vgl. Fig. 33; vgl. auch Aisenberg und Murray, 1971).

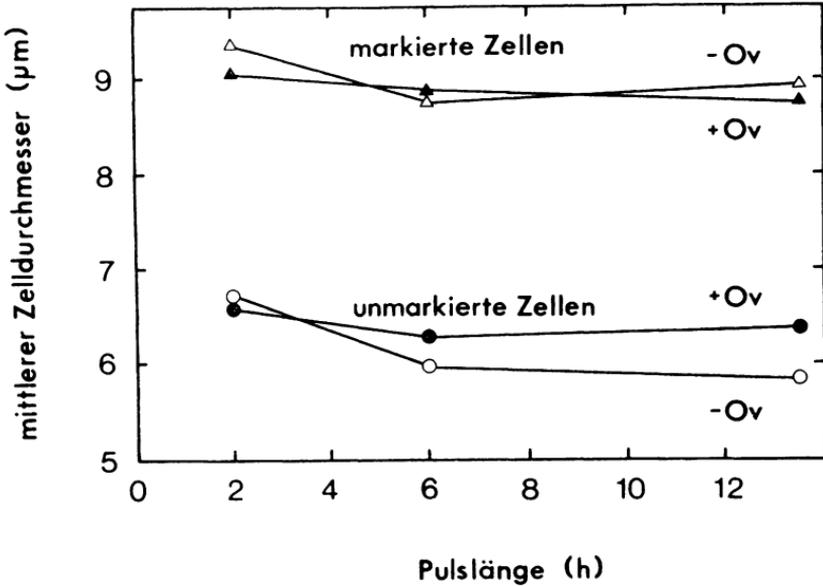


Fig. 20 Einfluß von Ovalicin auf den mittleren Durchmesser unmarkierter und [<sup>14</sup>C]Thymidin-markierter Milzzellen, gemessen bei verschiedenen Längen des Thymidinpulses

Die Meßwerte stammen aus Fig. 13 und 15.

- △, ○ - Hemmstoff
- ▲, ● + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)
- △, ▲ markierte Zellen
- , ● unmarkierte Zellen

Diese Beobachtungen zeigen klar, daß Ovalicin nicht generell den Durchgang der Lymphozyten durch die  $G_1$ -Phase verhindert (dies wäre z.B. bei Hemmung des  $G_0/G_1$ -Übergangs der Fall). Da Ovalicin wahrscheinlich nicht während der S-Phase wirkt (vgl. Kap. 11a) kann man schließen, daß die Vorgänge, die Voraussetzung für die Blastzellbildung sind, weniger gehemmt werden, als die für die Vorbereitung oder Aufrechterhaltung der DNA-Synthese nötigen Reaktionen.

## 2. Charakterisierung der Hemmung von Lymphomzellen durch Ovalicin

### a) Geschwindigkeit der Ovalicinwirkung

Die Untersuchung der Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin auf den Thymidineinbau von Milzzellen, die die Frage nach einer möglichen zellzyklusspezifischen Wirkung von Ovalicin beantworten sollte, erbrachte Ergebnisse, die wegen der Komplexität des Systems nicht eindeutig zu interpretieren sind. Deshalb erwartete ich durch Untersuchungen an einer monoklonalen Zelllinie eindeutigere Ergebnisse zu erhalten. Zu diesem Zweck boten sich S49.1-Lymphomazellen an, die - wie in Kapitel A gezeigt - durch Ovalicin sehr empfindlich gehemmt werden.

Zuerst war es wichtig festzustellen, wie rasch diese Hemmung des Thymidineinbaus bei den Lymphomazellen auftritt. Außerdem mußte geklärt werden, ob ebenso wie bei Milzlymphozyten die DNA-Synthese nicht vollständig hemmbar ist.

Eine exponentiell wachsende S49.1-Kultur (vgl. Methode 4b) wurde geteilt und zur einen Hälfte  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin zugesetzt; die Parallelkultur erhielt das gleiche Volumen BSS (s. Material 3a). Zu verschiedenen Zeiten nach Ovalicinzugabe wurden aus beiden Ansätzen Parallelproben entnommen und der [ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbau der Zellen in 1 Stunden Pulsen gemessen. Parallel dazu wurden Gesamtzellzahl und der Anteil vitaler Zellen mit der Trypanblaumethode bestimmt. Trägt man die Meßwerte halblogarithmisch auf, so findet man exponentielles Wachstum der Kontrollzellen mit einer Verdopplungsdauer von 16 Stunden, wie in der Literatur beschrieben (Horibata und Harris, 1970; Fig. 21). Der Anteil vitaler Zellen liegt immer über 95 % (Fig. 21). Parallel dazu nimmt - zumindest in den ersten 30 Stunden nach Versuchsbeginn - der Thymidineinbau in das säureunlösliche Zellycat ebenfalls mit einer Verdopplungsdauer von rund 16 Stunden zu<sup>+) (Fig. 21). In der Kultur mit Ovalicin ist die</sup>

---

<sup>+) Der nach ca. 30 h beobachtete, im Vergleich zur Zellvermehrung zu niedrige Thymidineinbau wird wahrscheinlich (Fortsetzung s. übernächste Seite)</sup>

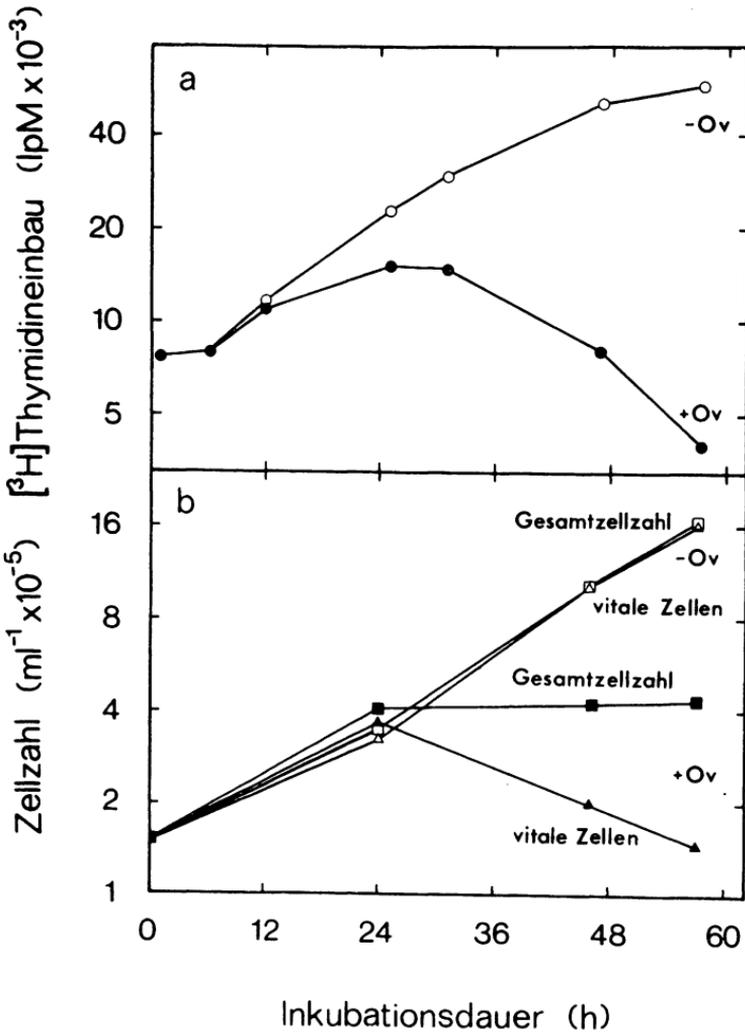


Fig. 21 Wirkung von Ovalicin auf die Kinetik des Thymidineinbaus und die Zellvermehrung von S49.1-Lymphomzellen

Die S49.1-Zellsuspension wurde mit frischem Medium (s. Methode 4b) auf  $0.15 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M zugesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Zelldichte und Vitalität (durch Ausschluß von Trypanblau) bestimmt (s. Methode 5). 1 Stunde vorher wurde in 0.9 ml Aliquots der  $[^3\text{H}]\text{Thymidineinbau}$  (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 0.5Ci/mMol; 1 h) gemessen (s. Methode 8a, 10a)

○, □, △ ohne Hemmstoff; ●, ■, ▲ + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$ )

Zellvermehrung bis 24 Stunden nicht von der Kontrollkultur zu unterscheiden. Danach hört jedoch die Zellvermehrung auf und der Anteil toter Zellen (durch Trypanblau anfärbare Zellen) nimmt stark zu (Fig. 21). Der Thymidineinbau von Ovalicin gehemmten Zellen verläuft parallel zur Anzahl vitaler Zellen, jedoch um wenige Stunden zu früheren Zeiten hin verschoben (Fig. 21). Eine signifikante Hemmung des Thymidineinbaus ist jedoch erst 12 - 24 Stunden nach Ovalicinzugabe feststellbar (Fig. 21; Fig. 22). Nach weiteren 24 Stunden Ovalicineinwirkung wird allerdings bereits eine Hemmung größer als 80 % erreicht, die sich bei Fortsetzung der Inkubation auf über 90 % erhöht (Fig. 22).

b) Untersuchungen zur Wirkungsverzögerung

Auffälliges Merkmal der Ovalicinwirkung auf S49.1-Lymphomzellen ist die lange Verzögerungsphase von rund 24 Stunden. Erst nach dieser Zeit nimmt die Hemmung des Thymidineinbaus rasch zu. Es bedarf jedoch noch zusätzlich der Dauer zweier Zellzyklen bis zur praktisch vollständigen Hemmung (Fig. 22). Was ist die Ursache dieser Wirkungsverzögerung?

Es gibt 2 naheliegende Erklärungsmöglichkeiten, wie in Kapitel 11a bereits erwähnt wurde:

- i) Ovalicin benötigt 12 - 24 Stunden, um an den Wirkort zu gelangen, d.h. die Toxinaufnahme ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hemmung.
- ii) Ovalicin muß erst durch metabolische Umwandlung in die wirksame Form des Hemmstoffs überführt werden. Für diesen Vorgang werden 12 - 24 Stunden benötigt.

---

durch Verbrauch des exogen angebotenen [ $^3\text{H}$ ]Thymidin verursacht. Bei den meist angewendeten Standard-Pulsbedingungen (1 h; 1  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]Thymidin/ml; 0.5 Ci/mMol) ist ein linear mit der Zellzahl zunehmender Einbau nur bis ungefähr  $1 \times 10^6$  Zellen/ml gegeben (ohne Beleg). Die besonders bei längerer Inkubationsdauer zu erwartenden Abweichungen wirken sich jedoch nur gering auf den zu berechnenden Hemmwert aus.

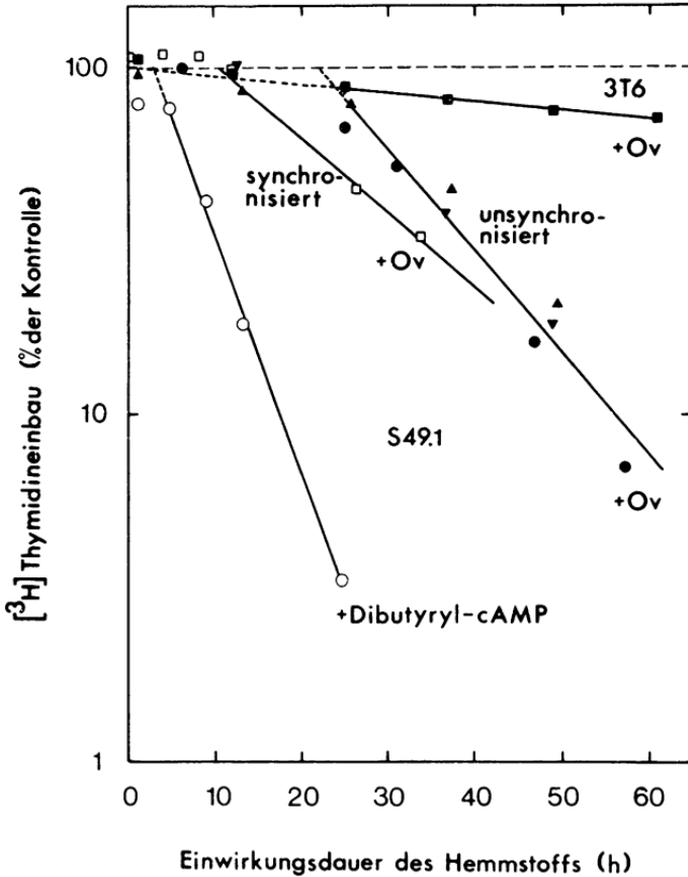


Fig. 22 Abhängigkeit der bei hoher Ovalicinkonzentration ( $2 \times 10^{-7}M$ ) zu messenden Restaktivität von der Einwirkdauer des Toxins

Die Hemkinetiken wurden aus Versuchen erhalten, die in den unten angegebenen Figuren beschrieben sind. Durch halblogarithmische Auftragung der Restaktivitäten gegen die Einwirkdauer und durch Extrapolation auf 100 % DNA-Syntheseaktivität wurden die Verzögerungsphasen der Hemmstoffwirkung bestimmt.

- ,▲,▼ Ovalicineinwirkung auf S49.1-Zellen (Meßdaten aus Fig. 21 (●), Fig. 23 (▲), Fig. 24 (▼))
- Ovalicineinwirkung auf Dibutyryl-cAMP synchronisierte S49.1-Zellen (Meßdaten aus Fig. 26)
- Ovalicineinwirkung auf 3T6-Zellen (Meßdaten aus Fig. 7)
- Hemmung des Thymidineinbaus durch Dibutyryl-cAMP (in Abwesenheit von Ovalicin)  
(Meßdaten aus Fig. 26)

α. Gibt es für Ovalicin Aufnahmebarrieren?

Um diese Frage zu beantworten, wurde untersucht, ob durch höhere Hemmstoffkonzentrationen schon vor der 24. Stunde nach Ovalicinzugabe eine stärkere Hemmung zu erzielen ist. Dies sollte man erwarten, wenn daß Eindringen von Ovalicin diffusionskontrolliert ist<sup>+</sup>). Zu Parallelansätzen wurde Ovalicin in logarithmischen Schritten zwischen  $2 \times 10^{-10}$  M und  $2 \times 10^{-6}$  M gegeben. Kontrollzellen erhielten das gleiche Volumen BSS-Puffer (s. Material 3a). Nach unterschiedlicher Einwirkdauer wurden die Zellen aufgewirbelt und der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau in säureunlösliches Material während einer Stunde bestimmt. Für jeden Meßzeitpunkt findet man einen maximal erreichbaren Hemmwert, der sich selbst bei 100 fach höherer Toxinkonzentration nicht erhöht (Fig. 23). Die Abhängigkeit der Restaktivität bei hohen Ovalicinkonzentrationen von der Einwirkdauer des Hemmstoffs ist reproduzierbar (vgl. Fig. 22; ●, ▲, ▼). Die für halbmaximale Hemmung benötigten Konzentrationen liegen zwischen  $0.7 - 1.0 \times 10^{-9}$  M Ovalicin. Die Maximalhemmung tritt zu jedem Meßzeitpunkt bei praktisch gleicher Konzentration auf. Hohe Ovalicinkonzentrationen können also nicht durch Erhöhung der Toxindiffusion durch die Zellmembran eine frühzeitige Hemmung des Thymidineinbaus erzwingen.

Diese Ergebnisse konnten auch durch Versuche mit Milzzellen bestätigt werden. Zur maximalen Ausprägung der Hemmung des frühen Thymidineinbaus zwischen der 12. und 14. Stunde nach Con A-Zugabe bedarf es einer 12 - 14 stündiger Einwirkdauer

---

<sup>+</sup>) Nach dem 1. Fick'schen Gesetz ist die Zahl der durch den Querschnitt q während der Zeit Δt hindurchtretenden Mole einer Substanz ihrem Konzentrationsgradienten  $dc/dx$  direkt proportional.

$$\Delta v = - D \times q \times \frac{dc}{dx} \times \Delta t ; \quad D = \text{Diffusionskoeffizient}$$

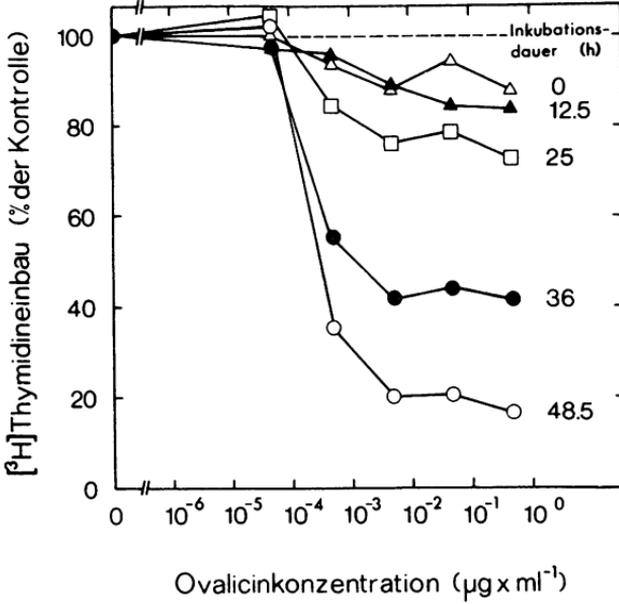


Fig. 23 Kinetik des Thymidineinbaus von S49.1-Lymphomzellen.  
Einfluß der Ovalicinkonzentration

Versuchsdurchführung s. Fig. 6. Zusätzlich wurden jedoch zu den angegebenen Zeiten den S49.1-Zellsuspensionen Proben entnommen und der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau während 1 h bestimmt (s. Fig. 6).

100 %-Werte:	Einwirkungsdauer von Ovalicin (h)	[ <sup>3</sup> H]Thymidineinbau (IpM)
	0 (Δ)	11 084 ± 396
	12.5 (▲)	23 213 ± 85
	25 (□)	39 115 ± 252
	36 (●)	56 431 ± 1306
	48.5 (○)	70 820 ± 340

von  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin (Fig. 18). Verringert man die Ovalicinkonzentration auf  $3 \times 10^{-9}$  M, eine Konzentration, die nach 30 stündiger Einwirkung den Thymidineinbau gerade noch maximal hemmt (vgl. Fig. 6), so erfolgt das Auftreten der Hemmung mit der gleichen Kinetik (Fig. 18).

Ovalicin muß also wahrscheinlich nicht über einen Zeitraum von 12 - 24 Stunden zu einer wirksamen Konzentration von den Zellen akkumuliert werden, da die Toxinmenge nicht limitierend für die Hemmung zu sein scheint.

β. Muß Ovalicin metabolisch aktiviert werden?

Wenn Ovalicin, um wirken zu können, zuerst in eine aktive Form überführt werden muß, sollte man modifiziertes Ovalicin - vorausgesetzt es ist membranpermeabel und wird nicht irreversibel an Zellbestandteile gebunden - im Kulturmedium finden können. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden S49.1-Zellen in 2 verschiedenen Ausgangszelldichten in Gegenwart von  $2 \times 10^{-6}$  M Ovalicin für rund 60 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände durch Zentrifugation gewonnen. Ein Kontrollüberstand wurde in ähnlicher Weise von einer S49.1-Kultur ohne Ovalicin erhalten. Die so isolierten Überstände sollten, wenn Metabolisierung stattgefunden hat, auf den Thymidineinbau frischer S49.1-Lymphomzellen rascher wirken, als parallel getestetes Ovalicin der gleichen Konzentration.

Zu Parallelansätzen wurde 1/10 Volumen der toxinhaltigen Überstände gegeben (resultierende theoretische Konzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin), 2 Kulturen erhielten die entsprechende Menge Kontrollüberstand, eine davon noch zusätzlich frisches Ovalicin in einer Konzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. Die Proliferation der Zellen wurde anhand des [ $^3\text{H}$ ]Thymidineinbaus während 1 Stunde verfolgt.

Ungeachtet der Hemmstoffvorbehandlung tritt die Hemmung der Thymidininkorporation in säurefällbares Material bei allen toxinhaltigen Kulturen gleichzeitig nach der schon in den vorangegangenen Versuchen beschriebenen Verzögerungsphase auf (Fig. 24). Dies bedeutet wohl, daß die Zellen Ovalicin nicht metabolisch aktivieren, oder die aktive Form des Hemmstoffs von den Zellen nicht ausgeschieden wird.

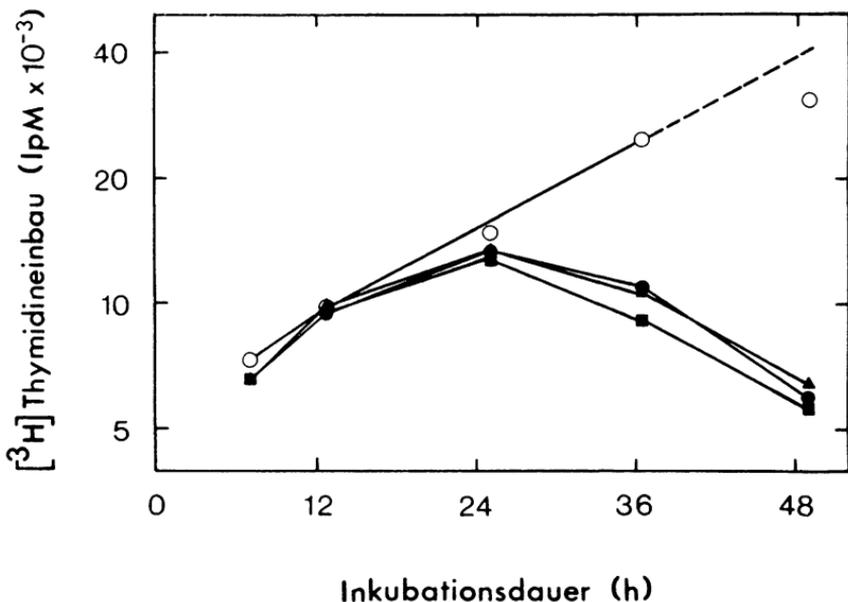


Fig. 24 Wirkung von 'metabolisiertem' Ovalicin auf die Kinetik des Thymidineinbaus von S49.1-Lymphomzellen

Exponentiell wachsende S49.1-Lymphomzellen (s. Methode 4b) erhielten 0.1 Volumen Ovalicin haltige S49.1-Kulturüberstände (Gewinnung s. unten), sodaß eine Toxinkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M (bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Menge Ovalicin) resultierte. Als Kontrolle dienten 2 Kulturen, die 0.1 Volumen Überstand ohne Hemmstoff erhielten; zu einer der beiden Kulturen wurde zusätzlich 'frisches' Ovalicin pipettiert (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M). 1 h vor den angegebenen Zeiten wurde der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau in säureunlösliches Material für 1 h gemessen (vgl. Fig. 6).

Gewinnung der Überstände: Es wurden S49.1-Kulturen mit 2 verschiedenen Ausgangszelldichten ( $0.15 \times 10^6$  und  $0.75 \times 10^6$ /ml) angesetzt (s. Methode 4b). Die Suspensionen wurden in Gegenwart von  $2 \times 10^{-6}$  M Ovalicin für rund 60 h bei 37°C inkubiert. Zur Gewinnung des Kontrollüberstands diente eine S49.1-Kultur ( $0.15 \times 10^6$  Zellen/ml) ohne Hemmstoffzusatz. Nach Ende der Inkubation wurden die Überstände in sterilen Plastikröhrchen abzentrifugiert (Christzentrifuge: 10 min, 1600 UpM (= 500 x g), 4°C) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

- + Überstand von S49.1-Kultur (Ausgangszelldichte  $0.15 \times 10^6$  pro ml) ohne Hemmstoff
- + Überstand von S49.1-Kultur (Ausgangszelldichte  $0.15 \times 10^6$  pro ml), + 'frisches' Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

Fortsetzung s. nächste Seite

- ▲ + Überstand von S49.1-Kultur (Ausgangszelldichte  $0.15 \times 10^6$  pro ml) mit Ovalicin (resultierende Endkonzentration: theor.  $2 \times 10^{-7}$  M)
- + Überstand von S49.1-Kultur (Ausgangszelldichte  $0.75 \times 10^6$  pro ml) mit Ovalicin (resultierende Endkonzentration: theor.  $2 \times 10^{-7}$  M)

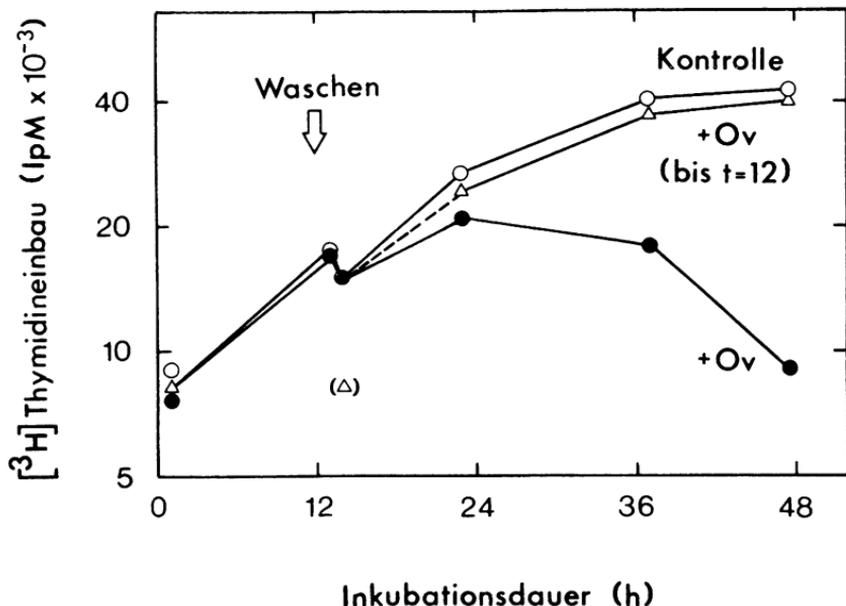
γ. Reversibilität der Ovalicinwirkung innerhalb der Verzögerungsphase

Nach 20 stündiger Einwirkung von  $3 \times 10^{-9}$  M Ovalicin (mit dem Mitogen zugesetzt) auf Milzzellen von Mäusen findet man nach Auswaschen von Ovalicin und anschließender Inkubation für 16 Stunden in hemmstofffreiem Medium praktisch keine Reversibilität der Hemmung des Thymidineinbaus (Hartmann et al., 1978). Dies ist nicht verwunderlich, denn ein postulierter Toxin/Rezeptor-Komplex sollte im Falle des Ovalicins sehr stabil sein und nur langsam zerfallen<sup>†</sup>). Ist es deshalb möglich, daß Ovalicin bereits während der Verzögerungsphase 'irreversibel' an Zellbestandteile bindet, die daraus resultierende Hemmung sich jedoch erst später zeigt?

Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurde zu 2 von 3 identischen S49.1-Lymphomzellkulturen  $2 \times 10^{-8}$  M Ovalicin gegeben, eine Konzentration die maximale Hemmung bewirkt. Die dritte Kultur diente als Kontrolle. Nach 12 stündiger Einwirkung wurde eine Ovalicin-haltige Kultur toxinfrei gewaschen (Verdünnung ca. 1 : 1000); die Zellen der beiden Kontrollkulturen wurden ebenfalls zentrifugiert, gewaschen und in frischem Medium suspendiert. Wasch- und Kulturmedien für die Kontrollen hatten die gleiche Zusammensetzung wie die Ausgangsmedien, d.h. in einem Fall waren sie mit, im anderen Fall ohne Ovalicin. Zur Bestim-

---

<sup>†</sup>) So zerfällt z. B. der Rifampicin/RNA-Polymerase (E. coli)-Komplex (Gleichgewichtskonstante =  $2.7 \times 10^{-10}$  M bei  $0^\circ\text{C}$ ; Wehrli et al., 1976) mit einer Halbwertszeit von 12 h bei  $0^\circ\text{C}$  (Wehrli et al., 1976)



**Fig. 25** Reversibilität der Ovalicinwirkung auf den Thymidineinbau von S49.1-Lymphomzellen

Exponentiell wachsende S49.1-Lymphomzellen wurden mit Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-8}$  M) versetzt (s. Methode 4b). Eine Kultur blieb zur Kontrolle ohne Hemmstoff (○). 12 h nach Toxinzugabe wurde das Medium abzentrifugiert, die Zellen gewaschen und in frischem Medium resuspendiert (s. Methode 6). Dabei wurde die Ovalicinkonzentration auf ungefähr 1/1000 der ursprünglichen Konzentration erniedrigt (Δ). Zur Kontrolle behielt eine Kultur während des Waschvorgangs und der anschließenden Inkubation Ovalicin ( $2 \times 10^{-8}$  M) (●). 1 h vor den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und während 1 h der Thymidineinbau in säureunlösliches Zellysat bestimmt (s. Methoden 7a, 8aβ, 10a).

mung der Zellproliferation wurde der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau in 1 Stunden Pulsen gemessen. Wie auch schon in vorangegangenen Experimenten tritt 24 Stunden nach Ovalicinzugabe im Vergleich zu Zellen ohne Hemmstoff eine deutliche Reduktion des Thymidineinbaus auf (Fig. 25; vgl. Fig. 21, 24). Zellen, die nach

12 stündiger Ovalicineinwirkung durch Waschen vom Hemmstoff befreit wurden, zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Ovalicin nur gering um ca. 10 % erniedrigte Aktivität (Fig. 25).

Innerhalb der ersten 12 Stunden nach Toxinzugabe wird also der Großteil der S49.1-Zellen nicht irreversibel geschädigt. Das kann bedeuten, daß Ovalicin nach 12 Stunden noch nicht geschädigt hat, bzw. die Wirkung in diesem frühen Zeitraum praktisch vollständig reversibel ist.

c) Wirkgeschwindigkeit von Ovalicin auf durch Dibutyryl-cAMP synchronisierte S49.1-Lymphomzellen

Im Milzzellsystem war es nicht möglich, eine eindeutige Antwort auf die Frage nach einer zellzyklusspezifischen Wirkung von Ovalicin zu finden (vgl. Kap. B1). Daher wurde nun die Frage mit Hilfe von S49.1-Zellen untersucht.

In einer exponentiell wachsenden Zellkultur proliferieren Zellen völlig asynchron, d.h. die Zellen sind statistisch über alle Zellzyklusphasen verteilt. Die Anzahl der Zellen, die sich in einer bestimmten Zellzyklusphase befinden, entspricht dem Anteil dieser Phase an der Gesamtzyklusdauer. Wirkt Ovalicin nur in einem zeitlich begrenzten Intervall des Zellzyklus, so sind nur die Zellen hemmstoffempfindlich, die sich in dieser Phase befinden. Auf die übrigen Zellen wirkt ein zellzyklusspezifischer Hemmstoff verzögert, nämlich erst nach Einwanderung in die toxinsensitive Phase. Vermehren sich Zellen dagegen synchron, so sollten sie alle innerhalb eines eng begrenzten Zeitraums in die hemmstoffempfindliche Phase eintreten und deshalb rascher gehemmt werden.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden S49.1-Lymphomzellen durch Einwirkung von Dibutyryl-cAMP ( $N^6, O^2$ -Dibutyryl-adenosin-3': 5'-zyklisches-monophosphat) synchronisiert. In Gegenwart von Theophillin, einem Inhibitor von Phosphodiesterasen (Cofino et al., 1975) kann Dibutyryl-cAMP, über die Aktivierung von Proteinkinase(n) und Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen (Kletzien et al., 1977) S49.1-Zellen in der frühen

G<sub>1</sub>-Phase anhalten (Coffino et al., 1975). Ovalicin sollte daher nach dem Auswaschen von Dibutyryl-cAMP rascher auf die nun synchronisierten Zellen wirken, als auf nicht synchronisierte S49.1-Zellen, vorausgesetzt, daß die Dibutyryl-cAMP-Wirkung reversibel ist (vgl. Coffino et al., 1975). Zudem kann man erwarten, wenn Ovalicin während der G<sub>1</sub>-Phase wirkt (vgl. Kap. B1), daß Ovalicin - mehrere Stunden nach Aufhebung des Blocks zugesetzt - keinen Einfluß mehr auf die Zellen hat.

Zu S49.1-Zellen wurden 0.2 mM Theophillin und 0.1 mM Dibutyryl-cAMP zugesetzt (wie in Coffino et al., 1975). Eine Kontrollkultur erhielt nur 0.2 mM Theophillin. Nach 24 Stunden wurden beide Kulturen zentrifugiert, die Zellen gewaschen und in frischem Medium mit 0.2 mM Theophillin, jedoch ohne Dibutyryl-cAMP resuspendiert. Die Zellkultur, die Dibutyryl-cAMP enthielt, wurde auf 4 kleine Kulturflaschen verteilt. 3 Flaschen erhielten Ovalicin (Endkonzentration ca.  $2 \times 10^{-7}$  M) und zwar eine sofort, eine nach 2 Stunden und die dritte nach 6 Stunden. Als Meßparameter diente der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau während einer Stunde in säurefällbares Zellysat. In der Kontrollkultur verdoppelte sich der Thymidineinbau vor und nach dem Waschen trotz Theophillin innerhalb von 16 Stunden. Dies entspricht der normalen Verdopplungsdauer von S49.1-Lymphomzellen (vgl. Kap. B2a). Theophillin hat also auf die Zellzyklusparameter keinen Einfluß (Coffino et al., 1975). Nach einer Verzögerungsphase von rund 4 Stunden fällt der Thymidineinbau in Dibutyryl-cAMP gehemmte Zellen mit einer Halbwertszeit von ca. 5.5 Stunden ab. 24 Stunden nach Dibutyryl-cAMP-Zugabe sind nur noch weniger als 10 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden (Fig. 22). Im Gegensatz zum erwarteten raschen Anstieg der DNA-Synthese nach Auswaschen des Dibutyryl-cAMPs<sup>+</sup>, nimmt

---

<sup>+</sup> In der Literatur sind folgende Zellzyklusparameter für S49.1-Zellen angegeben: G<sub>1</sub> = 2.1 h, S = 12 h, G<sub>2</sub>+M = 3 h (Coffino et al., 1975).

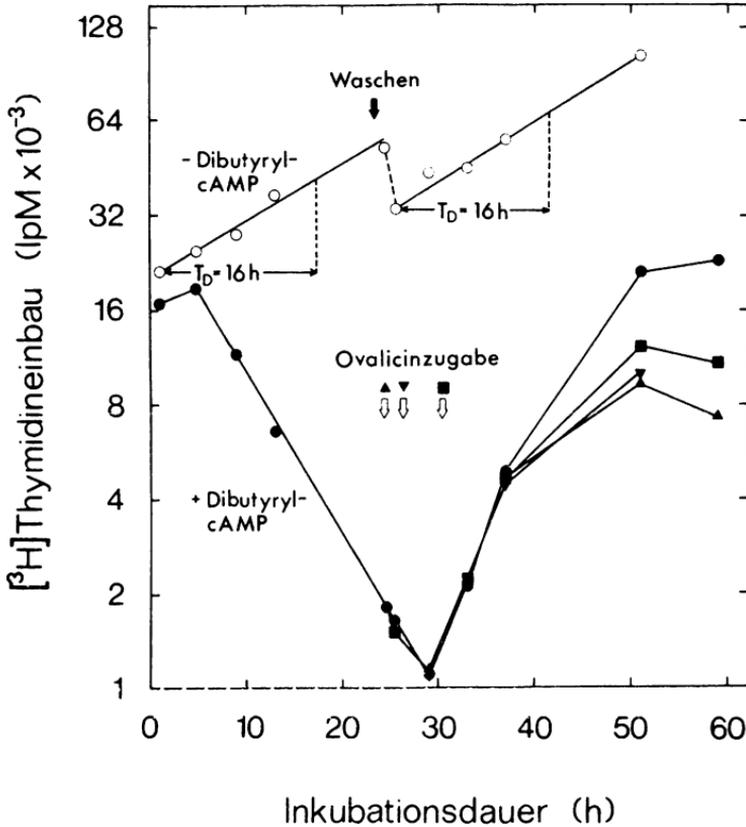


Fig. 26 Wirkung von Ovalicin auf den Thymidineinbau Dibutyryl-cAMP-synchronisierter S49.1-Lymphomzellen

2 exponentiell wachsende 50 ml S49.1-Kulturen (Ausgangszell-dichte:  $0.3 \times 10^6$  Zellen/ml) erhielten  $0.2 \text{ mM}$  Theophyllin (entspricht  $t = 0$ ). 1 Kultur erhielt zusätzlich in  $0.25 \text{ ml}$  BSS-Puffer (s. Material 3a)  $5 \mu\text{Mol}$  Dibutyryl-cAMP (Endkonzentration:  $0.1 \text{ mM}$ ). 24 h später wurden die Zellen mit Theophyllin haltigem Medium von Dibutyryl-cAMP freigesprochen (s. Methode 6) und in frischem Kulturmedium (mit  $0.2 \text{ mM}$  Theophyllin) suspendiert. Die Kultur ohne Hemmstoff wurde zur Kontrolle identisch behandelt. Anschließend wurden je  $10 \text{ ml}$  der Zellsuspensionen in kleine Kulturflaschen pipettiert und den synchronisierten Zellen sofort, 2 h und 6 h später Ovalicin (Endkonzentration: ca.  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) zugesetzt. 1 h vor den in der Abszisse angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen (s. Methode 7a) und der  $[^3\text{H}]\text{Thymidineinbau}$  ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $0.5 \text{ Ci/mMol}$ ) während 1 h bestimmt (s. Methoden 8a, 10a). Fortsetzung s. nächste Seite.

- 0.2 mM Theophillin; ohne Dibutyryl-cAMP und Ovalicin
  - 0.2 mM Theophillin, 0.1 mM Dibutyryl-cAMP (bis  $t = 24$ )
  - ▲ wie ●, jedoch  $t = 24.5$  Zugabe von Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)
  - ▼ wie ●, jedoch  $t = 26.5$  Zugabe von Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)
  - wie ●, jedoch  $t = 30.5$  Zugabe von Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)
- $T_D$  = Verdopplungsdauer

der Thymidineinbau bei den Zellen ohne Ovalicin zunächst für weitere 4 Stunden ab, bevor er langsam ansteigt, um 24 - 30 Stunden nach Aufhebung des Blocks die ursprüngliche Einbaurate wieder zu erreichen (Fig. 26, 23). Dies zeigt, daß mit Hilfe von Dibutyryl-cAMP nur schlecht synchronisierte S49.1-Zellen erhalten werden. Bei scharfer Synchronie hätte die DNA-Syntheseaktivität innerhalb von ca. 14 Stunden nach Durchlaufen eines Maximums, wieder auf sehr niedrige Werte abfallen müssen (s. Fußnote S.101). In Gegenwart von Ovalicin beginnt der Thymidineinbau zur gleichen Zeit wie bei den Zellen ohne Ovalicin; er erreicht jedoch nicht die Größe des Thymidineinbaus der Kontrollzellen. Die Hemmung prägt sich wie auch bei asynchron wachsenden Kulturen erst nach einer Verzögerungsphase aus, die mit 10 - 12 Stunden jedoch deutlich kürzer ist (Fig. 22, Tab, 22). Auch wenn Ovalicin erst später nach dem Aufheben des Dibutyryl-cAMP-Blocks zugesetzt wurde, vermag der Hemmstoff zu wirken. Unabhängig vom Zugabezeitpunkt tritt die Hemmung des Thymidineinbaus gleichzeitig ca. 11 Stunden nach dem Auswaschen des Dibutyryl-cAMPs auf. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich zumindest ein Teil der Zellen bereits 6 Stunden unbeeinflusst in der S-Phase. Ovalicin ist demnach wahrscheinlich nicht in der Lage, den  $G_1/S$ -Phasenübergang generell zu unterbinden, vorausgesetzt das Toxin hat innerhalb weniger Stunden seinen Wirkort in ausreichender Konzentration erreicht. Das Ausmaß der Hemmung ist - bezogen auf die Dauer der Ovalicineinwirkung - zumindest ab  $t = 50$  praktisch identisch (Fig. 26).

Die Verkürzung der Verzögerungsphase bei Dibutyryl-cAMP synchronisierten S49.1-Zellen kann als Hinweis auf eine gewisse

Zellzykluselektivität des Ovalicinangriffs gesehen werden. Eine zeitliche Lokalisierung der Ovalicin sensitiven Phase ist jedoch nicht möglich, da mit Dibutyryl-cAMP offensichtlich nur eine relativ diffuse Synchronie zu erzielen ist.

### C Biochemische Eingrenzung des Wirkorts

In den Kapiteln A und B habe ich die zellselektive Wirkung von Ovalicin gezeigt und versucht, seinen Angriff innerhalb des Zellzyklus einzugrenzen. Wie ist nun die differentielle Wirkung von Ovalicin auf verschiedene Zelltypen biochemisch verursacht? Können die Voraussagen über Zellzyklusselektivität bestätigt und der Wirkort bestimmt, oder zumindest weiter eingegrenzt werden?

#### 1. Früher Membranlipidstoffwechsel

Die bisherigen Versuche schließen eine Hemmung der Vorgänge aus, die kurz auf Mitogenkontakt folgen:

Die Wirksamkeit von Ovalicin gegenüber S49.1-Lymphomzellen macht eine Hemmung des  $G_0/G_1$ -Phasenübergangs unwahrscheinlich, da exponentiell proliferierende Zellen definitionsgemäß kein Ruhephase durchlaufen. Auch die durch Ovalicin kaum beeinflusste Blastzellbildung (vgl. Kap. B1b), für die frühe Lipidsynthese notwendig ist (Pratt, 1977), spricht dafür, daß Ovalicin nicht in frühe Vorgänge nach Mitogenstimulation eingreift. Dies kann man auch aus der Beobachtung ableiten, daß Ovalicin, 6 Stunden nach Mitogen zugesetzt, den Thymidineinbau zur 21. bzw. 38. Stunde noch maximal hemmt (Fig. 18; vgl. Hartmann et al., 1978). Durch Untersuchung biochemischer Stoffwechselvorgänge, die bald nach Mitogenzugabe ablaufen, sollen diese aus zellbiologischen Vorgängen abgeleiteten Schlußfolgerungen überprüft werden.

Zu den frühesten Änderungen nach Lektinbindung an Lymphozyten zählt die drastische Erhöhung des Lipid-'turn overs' in der Plasmamembran. Innerhalb weniger Minuten nach Con A-Zugabe ist eine Zunahme des Ölsäureeinbaus in die Lecithinfraktion von Lymphknoten-zellen aus Kaninchen feststellbar (Resch und Ferber, 1972). Ursache dafür ist die rasche Aktivierung der mikrosomalen Acyl-CoA : Lysolecithyl-Transferase und die Änderung ihrer Substratspezifität zugunsten ungesättigter Fettsäuren. Durch den bevorzugten Ersatz von gesättigten durch ungesättigten Fettsäuren in der Position 2 der Phospholipide wird die Fluidität der Membran erhöht (Ferber et al., 1974). Dies hat eine erhöhte Permeabilität für Ionen und Metabolite zur Folge (Resch et al., 1977) und führt schließlich über die morphologische Umwandlung in Blastzellen zu DNA-Synthese und Zellteilung (Pratt et al., 1977).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sollte man erwarten, daß Ovalicin keinen Einfluß auf die frühe Stimulation des Lipidstoffwechsels hat. Um diese Vermutung abzusichern, wurde der [ $^{14}\text{C}$ ]Acetateinbau in Gesamtlipid und in die Lecithinfraktion<sup>+</sup>) während der ersten 4 Stunden nach Con A-Zugabe in Gegenwart von  $2 \times 10^{-7}\text{M}$  Ovalicin bestimmt. Als hemmstofffreie Kontrollen dienten Mäusemilzzellkulturen mit und ohne Con A. Nach 4 stündiger Einwirkung von Con A auf Milzzellen findet man eine rund 30 % (22 - 43 %) Stimulation des [ $^{14}\text{C}$ ]Acetateinbaus in Gesamtlipid im Vergleich zu unstimulierten Lymphozyten (Tab. 7). Deutlicher fällt die Stimulation aus, wenn man den [ $^{14}\text{C}$ ]Acetateinbau in die Lecithinfraktion vergleicht. Die Inkorporation liegt hier um rund 70 % (44 - 96 %) über der unstimulierten Zellen (Tab. 7). Diese selektive Stimulierung des Fettsäureaustausches bei Lecithin spiegelt sich in einem erhöhten Lecithinanteil am markierten Gesamtlipid wider (Tab. 7). Die Steigerung des Lipidstoffwechsels durch Con A ist in Milzzellen aus Mäusen allerdings niedrig im Vergleich zum 5 fach höheren Acetateinbau in Con A-behandelte Lymphknotenzellen aus Kaninchen (Resch und Ferber, 1972). Pratt et al. (1976) beobachteten gegen eine ähnlich geringe Stimulation bei Con A- oder Phytohämagglutinin-aktivierten menschlichen Blutlymphozyten. In Gegenwart von Ovalicin wird der Lipidstoffwechsel durch das Mitogen ebenfalls stimuliert. In Gesamtlipid (um 38 - 83 %) und Lecithin (um 64 - 200 %) wird vermehrt [ $^{14}\text{C}$ ]Acetat inkorporiert. Die Stimulation ist allerdings im Durchschnitt fast doppelt so groß, wie bei den Kontrollzellen ohne Hemmstoff (Tab. 7).

Dieser Versuch bestätigt die zuvor beschriebenen Befunde, daß Ovalicin die frühen Reaktionen nach Mitogen/Zellkontakt nicht hemmt.

---

<sup>+</sup>) Acetat wird - nach biochemischer Umwandlung in Fettsäuren - wie exogen angebotene Ölsäure bevorzugt in die Lecithinfraktion von mitogenaktivierten Lymphozyten inkorporiert (Resch und Ferber, 1972).

Tab. 7 Einfluß von Ovalicin auf den Acetateinbau in Totallipid und Lecithin stimulierter Lymphozyten kurz nach Con A-Zugabe.

Jeweils  $33 \times 10^6$  Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden nach 15 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoäthanol stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). 1 Kultur erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M, einer weiteren parallel angesetzten Kultur wurde nur 2-Mercaptoäthanol zupipettiert. Zur radioaktiven Markierung der Lipide wurde zu den Kulturen sofort anschließend je 375 nMol [ $^{14}$ C]Acetat (1.4  $\mu$ Ci/ml; 0.056 Ci/mMol; 25 nMol Acetat/ml) gegeben, 4 h später die Lipide extrahiert (s. Methode 12a) und die Menge an radioaktiv markiertem Gesamtlipid und Lecithin bestimmt (s. Methoden 12a, b; 10c).

Zusätze	[ $^{14}$ C] Acetateinbau (IpM) in		Anteil der Lecithinfraktion am Gesamtlipid (%)
	Totallipid	Lecithin	
-	7 942	999	12.6
+ Con A	9 700 $\pm$ 380	1 642 $\pm$ 70	17.0
+ Con A + Ovalicin	12 112	2 047	16.9

## 2. DNA-Synthese isolierter Kerne

Ovalicin wirkt nicht oder nur sehr langsam auf den Thymidineinbau von in S-Phase befindlichen Lymphozyten (vgl. Fig. 18; Hartmann et al., 1978) oder Lymphomzellen (Fig. 22). Man sollte daher erwarten, daß Ovalicin keinen Einfluß auf die Polymerisation der Desoxyribonukleosidtriphosphate zu DNA ausübt.

Lymphozytenkerne, die durch milde Detergenzbehandlung isoliert wurden, können in einem zellfreien System Desoxyribonukleosidtriphosphate in hochmolekulare DNA einbauen (Benz und Strominger, 1975; Tseng und Goulian, 1975). Das System ist von Magnesiumionen, den 4 Desoxyribonukleosidtriphosphaten und ATP (bzw. einem ATP

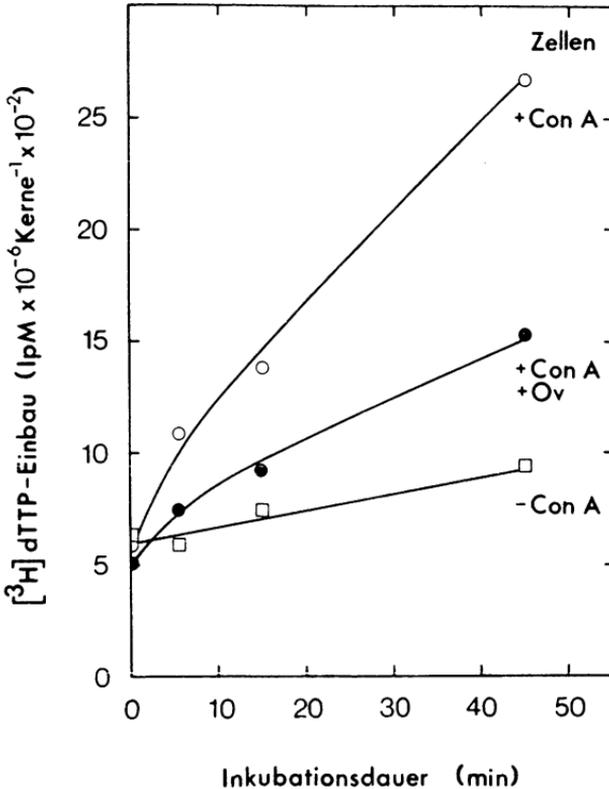


Fig. 27 Kinetik des [<sup>3</sup>H]dTTP-Einbaus in DNA von Kernen aus unstimulierten, stimulierten und Ovalicin gehemmten, stimulierten Milzzellen

Jeweils  $100 \times 10^6$  Lymphozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden ohne Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) in Abwesenheit von 2-Mercaptoäthanol stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Das Kulturmedium enthielt statt 2.5 %, 5 % fötales Kälberserum. Eine Kultur blieb ohne Con A, während einer anderen gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin (Endkonzentration:  $7 \times 10^{-7}$  M) zugesetzt wurde. 46 h nach Versuchsbeginn wurden Kerne präpariert (s. Methode 13a $\alpha$ ) und der [<sup>3</sup>H]dTTP-Einbau in säureunlösliches Kernlysat bestimmt (s. Methoden 8c, 14a). Die Werte wurden um die Nicht-linearität der Kernzahlabhängigkeit des dTTP-Einbaus korrigiert und der Einbau auf  $1 \times 10^6$  Kerne normiert (s. Methode 14b)

Fortsetzung der Legende s. nächste Seite.

- Kerne aus Lymphozyten + Con A ( $1.03 \times 10^6$  Kerne/Test)
- Kerne aus Lymphozyten + Con A, +  $7 \times 10^{-7}$  M Ovalicin ( $1.52 \times 10^6$  Kerne/Test)
- Kerne aus Lymphozyten - Con A ( $1.35 \times 10^6$  Kerne/Test)

$[^3\text{H}]$  Thymidineinbau ganzer Zellen: Vor Isolierung der Kerne wurden zur Bestimmung der DNA-Syntheseaktivität ganzer Zellen den verschiedenen Ansätzen 39 h nach Versuchsbeginn Proben entnommen (s. Methode 7a),  $[^3\text{H}]$ Thymidin ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ,  $6.7 \text{ Ci/mMol}$ ) zugesetzt (s. Methode 7c) und 6 h später die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a, 10a).

Zellen	$[^3\text{H}]$ Thymidineinbau (IpM)
- Con A	1 466 $\pm$ 6
+ Con A	11 021 $\pm$ 17
+ Con A, + Ovalicin	3 861 $\pm$ 95

regenerierenden System) abhängig (vgl. Tab. 3). Letzteres spricht dafür, daß  $[^3\text{H}]$ dTTP hauptsächlich durch Replikation in die DNA gelangt und nicht durch Reparatursynthese (Benz und Strominger, 1975; Jazwinski et al., 1976; vgl. auch Schläger, 1978). Die DNA wird dabei, ähnlich wie in intakten Zellen, diskontinuierlich und semikonservativ kopiert (Benz und Strominger, 1975; Tseng und Goulian, 1975; Thompson und Mueller, 1975). Bevorzugt wird die Polymerisationsreaktion an in ganzen Zellen begonnenen Stellen (Replikons) fortgeführt (Thompson und Mueller, 1975; für eine Übersicht s. Edenberg und Hubermann, 1975), denn Neuintiation scheint nur in begrenztem Maße möglich zu sein (Tseng und Goulian, 1975) und wie auch bei anderen eukariotischen Zellen von Zytoplasmafaktoren abzuhängen (Jazwinski et al., 1975; Grummt, 1978). Trotzdem reflektiert das zellfreie DNA-Replikationssystem die in ganzen Zellen gefundene DNA-Syntheseaktivität (Thompson und Mueller, 1975; Benz und Strominger, 1975; vgl. Fig. 27).

Dieses System erscheint geeignet, den Einfluß von Ovalicin zumindest auf die Elongationsreaktion der DNA-Replikation zu untersuchen. Mißt man den  $[^3\text{H}]$  dTTP-Einbau in alkalistabile Polymere von Lymphozytenkerne für 45 Minuten, so ist selbst bei  $3 \times 10^{-6}$  M Ovalicin keine Hemmung meßbar (Tab. 8). Auch auf den dTTP-Einbau durch Ultraschall zerstörter Kerne, die noch ca. 40 % der DNA-Syntheseaktivität intakter Kerne (Tab. 8) bei gleicher Einbauki-

netik (ohne Beleg) zeigen, hat Ovalicin ( $3 \times 10^{-6}$  M) ebenfalls keinen Einfluß (Tab. 8). In diesem dissoziierten System sollte Ovalicin freien Zutritt zu allen Kernkomponenten haben. Offensichtlich ist die Polykondensation der DNA-Bausteine nicht der direkte Angriffspunkt für Ovalicin, vorausgesetzt Ovalicin ist die biologisch aktive Form des Hemmstoffs.

Tab. 8 Einfluß von Ovalicin auf den dTTP-Einbau intakter und Ultraschall behandelter Lymphozytenkerne

100 x 10<sup>6</sup> nicht vorinkubierte Lymphozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden durch Zugabe von 100 µg Con A (Endkonzentration: 2µg/ml) stimuliert (s. Methode 4aβ). Die Zellen von Experiment 2 erhielten 24 h später  $5 \times 10^{-7}$  Mol 2-Mercaptoethanol (resultierende Endkonzentration:  $10^{-5}$  M). 46 h (Experiment 1) bzw. 50 h (Experiment 2) nach Mitogenzugabe wurden aus den Zellen Kerne präpariert (s. Methode 13aα), ein Teil der Kerne durch Ultraschall aufgeschlossen (s. Methode 13c) und der [<sup>3</sup>H]dTTP-Einbau in alkalistabiles, säurefällbares Kernlysat während 45 min bei 37°C bestimmt (s. Methoden 8c, 14a). Die Meßwerte wurden um den Leerwert (Inkubation ohne Kerne) von 40 IpM korrigiert.

Experiment	Vorbehandlung der Kerne	[ <sup>3</sup> H]dTTP-Einbau in Kerne (IpM x 10 <sup>-6</sup> Kerne <sup>-1</sup> )	
		- Ovalicin	+ Ovalicin ( $3 \times 10^{-6}$ M)
1	-	436 ± 1	430 ± 16
2	-	1 032 ± 63	nicht bestimmt
	mit Ultraschall	408 ± 13	398 ± 1

Auf der anderen Seite ist die DNA-Synthese in Kernen Ovalicin-gehemmter Zellen deutlich reduziert im Vergleich zur Aktivität eines zellfreien Systems aus unbehandelten Zellen (Fig. 27; Hartmann et al., 1978).

Inkubiert man Kerne, die aus ungehemmten, mit  $7 \times 10^{-7}$  M Ovalicin gehemmten und unstimulierten Lymphozyten nach 46 stündiger Kultur isoliert wurden, in der DNA-Synthesemischung (vgl. Methode 14a), so findet man bei allen 3 Präparationen einen für 10 - 20 Minuten linearen Einbau von  $[^3\text{H}]$ dTTP (vgl. Schläger, 1978). Die Relation der Aktivitäten entspricht angenähert dem Verhältnis des in ganzen Zellen gemessenen Thymidineinbaus (Fig. 27). Die in Zellkultur gemessene Hemmung der DNA-Synthese bleibt also auch im zellfreien System erhalten, hervorgerufen durch eine verringerte Elongationsgeschwindigkeit oder eine erniedrigte Zahl von in intakten Zellen initiierten Replikons. Die im zellfreien System gefundenen Hemmwerte betragen jedoch im Mittel (6 Versuche) nur rund 75 % der in Zellen beobachteten Hemmung der DNA-Synthese (ohne Beleg).

Dieser Versuch zeigt, daß Ovalicin die Bildung eines wichtigen Bausteins der DNA-Synthesemaschinerie verhindert. Wie auch bei anderen Hemmstoffen, wie z. B. Cycloheximid (Hershey et al., 1973), Colchicin (Hauser et al., 1976) und Methylglyoxal-bis-(guanyldiazon)<sup>+</sup> (Krokan und Eriksen, 1977), läßt sich das defekte DNA-Replikationssystem in vitro nicht durch Desoxyribonukleosidtriphosphate supplementieren. Dies schließt aus, daß Ovalicin wie Hydroxyharnstoff, einem Hemmstoff des Ribonukleosiddiphosphat-Reduktasesystems, den DNA-Vorläuferpool erniedrigt und so die DNA-Synthese reduziert. In diesem Fall ist es möglich, die DNA-Syntheseaktivität von Kernen aus Hydroxyharnstoff gehemmten HeLa-Zellen in vitro vollständig durch Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten zu rekonstituieren (Hershey et al., 1973).

---

<sup>+</sup>) Cycloheximid ist ein Hemmstoff der Proteinsynthese, Colchicin des mikrotubulären Systems. Methylglyoxal-bis-(guanyldiazon) inhibiert die S-Adosylmethionin-Decarboxylase, ein Schlüssel-enzym der Spermidinbiosynthese (Williams-Ashman und Schenone, 1972).

### 3. Proteinsynthese

In Eukarionten sind Protein- und DNA-Synthese eng miteinander verknüpft (Seale und Simpson, 1975; Richter, 1977; Hartmann et al., 1978). Für die in der S-Phase beginnende DNA-Replikation müssen durch Proteinsynthese die zur Synthese und Verpackung der DNA benötigten Proteine bereitgestellt werden. Ist ihre korrekte Synthese durch Inhibitoren der Proteinsynthese (Hartmann et al., 1978) oder durch Aminosäureanaloga (Weintraub, 1972) verhindert, so hört die DNA-Replikation rasch auf. Als Kopplungsglieder kommen Histone, die für die Chromatinbildung essentiell sind (Weintraub, 1972; Elgin und Weintraub, 1975; Weintraub, 1976) oder kurzlebige Proteine in Frage (Gautschi und Kern, 1973; Brooks, 1977).

Es ist daher denkbar, daß die bisher untersuchte DNA-Synthesehemmung nur einen sekundären Effekt darstellt und durch Ausschaltung der Proteinsynthese hervorgerufen wird. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Ovalicin auf die Proteinsynthese untersucht.

#### a) Vergleich von Protein- und DNA-Synthesehemmung

Der Einbau von radioaktiv markiertem Leucin in den säureunlöslichen Anteil des Zellysats diente als Maß für Proteinbiosynthese. Eine 14 stündige Inkubation von Lymphozyten mit  $2 \times 10^{-7}$  Mol/l Ovalicin führt zu einer 20 - 30 % Reduktion der zwischen der 12. - 14. Stunde nach Mitogenzugabe gemessenen Proteinsynthese, während die zu diesem Zeitpunkt geringe DNA-Syntheseaktivität bereits zu 60 - 70 % gehemmt wird (Tab. 9; vgl. Fig. 9 und Hartmann et al., 1978). Durch Verlängerung der Einwirkdauer von Ovalicin auf 38 Stunden erhöht sich die Hemmung der Proteinsynthese auf 40 - 50 % und liegt damit nur gering unter der Hemmung des gleichzeitig gemessenen Thymidineinbaus (Tab. 9)<sup>+</sup>. Die Ursache der zunehmenden Proteinsynthesehemmung, die

---

<sup>+</sup>) Als Ursache für die Erhöhung der Proteinsynthesehemmung könnte eine Änderung der spezifischen Radioaktivität des radioaktiv markierten Leucins durch Erschöpfung der unmarkierten Aminosäure im Medium in Frage kommen (Kay et al., 1971).  
Fortsetzung der Fußnote s. nächste Seite

Tab. 9 Vergleich der Hemmung von Thymidin- und Leucineinbau  
Con A-stimulierter Lymphozyten durch Ovalicin

Nach 10 - 12 stündiger Vorinkubation wurden jeweils  $7.8 \times 10^6$  Zellen (Experiment 1:  $1.75 \times 10^6$ /ml) bzw.  $8.8 \times 10^6$  Zellen (Experiment 2, 3:  $2 \times 10^6$ /ml) durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) in Normalmedium (Experiment 2, 3; s. Material 3a) bzw. in Medium mit 22 % des Normalgehalts an Leucin (Experiment 1; s. Methode 7b) stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Gleichzeitig mit dem Mitogen erhielt ein Teil der Kulturen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. Zu den angegebenen Zeiten wurden den Kulturen Proben entnommen (s. Methode 7a), [ $^3\text{H}$ ] Leucin ( $5 \mu\text{Ci/ml}$ ; resultierende spezifische Radioaktivität:  $0.063 \text{ Ci/mMol}$  (Experiment 1) bzw.  $0.013 \text{ Ci/mMol}$  (Experiment 3)) oder [ $^3\text{H}$ ] Thymidin ( $1 \mu\text{Ci/ml}$ ;  $0.5 \text{ Ci/mMol}$ ) zugesetzt (s. Methode 7c) und 2 h später die säurefällbare Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 8b $\beta$ , 10a).

Zusätze	Zugabezeitpunkt des radioaktiven Vorläufers ( h nach Con A-Zugabe)	[ $^3\text{H}$ ] Leucineinbau (IpM)	[ $^3\text{H}$ ] Thymidinein- bau (IpM)
-	12	(100 %) $7\ 741 \pm 27$	(100 %) $1\ 094 \pm 28$
+ Ovalicin $2 \times 10^{-7}$ M		Experiment 1 $5\ 700 \pm 139$ (73 %)	Experiment 2 $443 \pm 30$ (37 %)
-	36	(100 %) $8\ 565 \pm 308$	(100 %) $40\ 594 \pm 1\ 664$
+ Ovalicin $2 \times 10^{-7}$ M		Experiment 3 $4\ 391 \pm 62$ (51 %)	Experiment 3 $13\ 250 \pm 934$ (35 %)

Da ungehemmte Milzzellen die essentielle Aminosäure Leucin dem Medium rascher entnehmen, sollte bei Zugabe von [ $^3\text{H}$ ] Leucin eine höhere spezifische Radioaktivität resultieren als bei gehemmten Zellen. Dies trifft wahrscheinlich nicht zu, da weniger gut stimulierte Zellen (ohne Mercaptoäthanol), deren Aktivität nur ca. 20 % im Vergleich zu Zellen mit Mercaptoäthanol ausmacht, trotz geringerem Leucinverbrauch unter den gleichen Meßbedingungen in praktisch gleichem Ausmaß gehemmt werden (ohne Beleg).

bei gleich niedrigen Ovalicinkonzentrationen wie die Hemmung der DNA-Synthese eintritt (ohne Beleg), könnte der Ausfall der DNA-Synthese sein. Dies wird genauer in Abschnitt 3d untersucht.

#### b) Zellfreie Proteinsynthese

Die Proteinsynthese wird nach kurzer (14 Stunden) und langer (40 Stunden) Ovalicineinwirkung weniger gehemmt als die DNA-Synthese, gemessen am Thymidineinbau in säurefällbares Zelllysate (Tab. 9). Das macht eine direkte Beeinflussung der Ribosomen oder anderer Komponenten des Proteinsyntheseapparates wenig wahrscheinlich. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Wirksamkeit von Ovalicin auf zwei zellfreie Proteinsynthesesysteme aus Lymphozyten untersucht. Dabei handelt es sich um die Poly rU gesteuerte Polyphenylalaninsynthese bei 10 mM  $Mg^{2+}$  und den Einbau von  $[^3H]$ Leucin in säureunlösliches Material mit endogener mRNA als Matritze. Beide Ribosomensysteme wurden mit Überstandsfaktoren aus Rattenleber (s. Methode 15) supplementiert.

Aus stimulierten Lymphozyten wurden 42 Stunden nach Mitogenzugabe Ribosomen isoliert und der Einfluß von Ovalicin auf ihre Aktivität mit Hilfe von  $[^3H]$ Leucin bzw.  $[^3H]$ Phenylalanin als markierte Vorläufer innerhalb von 15 Minuten bei 37°C untersucht. In keinem der beiden Systeme wird der Einbau der radioaktiv markierten Aminosäuren in säurefällbares Material durch Ovalicin bis zu  $10^{-4}$  M signifikant gehemmt (Tab. 10, 11). Einschränkung muß allerdings erwähnt werden, daß die Versuche mit Poly rU als exogener mRNA wahrscheinlich bei Ribosomenüberschuß (vgl. Fig. 4) durchgeführt wurden, sodaß durch Limitierung einer oder mehrerer Komponenten des zellfreien Systems der gemessene  $[^3H]$ Phenylalanineinbau nicht proportional der Ribosomenaktivität ist (vgl. Fig. 4b). Eine geringe Hemmung könnte unter solchen Bedingungen wahrscheinlich nicht gefunden werden. Zur Kontrolle wurde jedoch die Wirkung von  $2 \times 10^{-5}$  M Verrucaric A, einem Proteinsyntheseinhibitor (Hartmann et al., 1978), unter den gleichen Bedingungen getestet. Hier wurde eine rund 50 % Hemmung nach Abzug des Phenylalanin-

Tab. 10 Wirkung von Ovalicin auf die Poly rÜ gesteuerte Polyphenylalaninsynthese in einem zellfreien System mit Ribosomen aus stimulierten Lymphozyten

Für die Stimulation der Milzzellen und die Ribosomenisolierung siehe Tab. 12. Zur Bestimmung der Poly rÜ gesteuerten Polyphenylalaninsynthese wurde der Einbau von [<sup>3</sup>H]Phenylalanin (1 µCi/Test; 9 Ci/mMol) in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe während 15 min bei 37°C gemessen (s. Methode 15). Die pro Test eingesetzten Ribosomen enthielten 9.45 µg RNA (s. Methode 15).

Zusätze	[ <sup>3</sup> H]Phenylalanineinbau (IpM)
-	2 630 ± 494
Ovalicin 7 x 10 <sup>-7</sup> M	2 707 ± 310
1 x 10 <sup>-4</sup> M	2 545 ± 293
ohne Ribosomen	1 040 ± 271
ohne Poly rÜ	1 580 ± 43
Verrucarin A 2 x 10 <sup>-5</sup> M	1 811 ± 129

einbaus ohne Ribosomen beobachtet. Der Versuch ohne Zusatz exogener RNA wurde auch mit einer niedrigeren Ribosomenmenge durchgeführt. Die Resultate decken sich mit denen aus dem hier beschriebenen Experiment (ohne Beleg). Diese Versuche bestätigen die in Abschnitt C3a beschriebenen Ergebnisse. Das Ribosom oder andere Komponenten des Proteinsyntheseapparats sind nicht der molekulare Wirkort von Ovalicin.

Tab. 11 Wirkung von Ovalicin auf den von endogener mRNA gesteuerten Leucineinbau in einem zellfreien System mit Ribosomen aus stimulierten Lymphozyten

Für die Stimulation der Milzzellen und die Ribosomenisolierung siehe Tab. 12. Zur Bestimmung der Proteinsynthese an endogener mRNA wurde der Einbau von  $[^3\text{H}]$  Leucin (1  $\mu\text{Ci}/\text{Test}$ ; 58 Ci/mMol) während 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  gemessen (s. Methode 15). Die pro Test eingesetzten Ribosomen enthielten 9.45  $\mu\text{g}$  RNA (s. Methode 15).

Zusätze	$[^3\text{H}]$ Leucineinbau (IpM)
-	1 464 $\pm$ 84
Ovalicin $7 \times 10^{-7}$ M	1 676 $\pm$ 23
Ovalicin $1 \times 10^{-4}$ M	1 739 $\pm$ 213
ohne Ribosomen	375 $\pm$ 160

Eine andere Beobachtung ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert. Isoliert man 42 Stunden nach Con A-Zugabe aus Ovalicin gehemmten Lymphozyten ( $2 \times 10^{-7}$  M) Ribosomen und bestimmt ihre Menge anhand des Nukleinsäuregehalts durch Vergleich der Extinktion bei 280 und 260 nm (Warburg und Christian, 1941), so findet man nur rund 50 % der Ribosomenmenge aus unbehandelten Zellen (Tab. 12). Beide Präparationen haben den gleichen Quotienten  $\Delta E_{280}/\Delta E_{260}$  und somit ein ähnliches Protein/Nukleinsäure-Verhältnis. Obwohl diese Bestimmungsmethode relativ unempfindlich ist, läßt sich die Ribosomenmenge anhand ihres RNA-Gehaltes im gemessenen Bereich recht gut ermitteln ( $\pm 10$  %, ohne Beleg). Die zum Vergleich bestimmte Hemmung des  $[^3\text{H}]$  Leucineinbaus in ganze Milzzellen zwischen der 40. und 44. Stunde nach Stimulation beträgt 46 % (Tab. 12). Die nach 42 Stun-

den gefundene Ribosomenmenge entspricht recht genau der in den Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt gefundenen Proteinsyntheseaktivität. Die Wirkung von Ovalicin auf die Proteinsynthese in ganzen Zellen kann also einfach auf einer quantitativen Reduktion des katalytischen Apparats der Proteinsynthese beruhen.

Tab. 12 Einfluß von Ovalicin auf den Ribosomengehalt Con A-stimulierter Lymphozyten

2 Ansätze mit jeweils  $115 \times 10^6$  nicht vorinkubierten Milzzellen ( $2.3 \times 10^6/\text{ml}$ ) erhielten je  $50 \mu\text{g}$  Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1 Kultur zusätzlich  $2.5 \mu\text{g}$  Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) (s. Methode 4a $\beta$ ). 23 h später wurde 2-Mercaptoäthanol in einer Endkonzentration von  $10^{-5} \text{ M}$  zugesetzt. 40 h nach Mitogenzugabe wurden je  $2 \times 0.9 \text{ ml}$  der Zellsuspensionen entnommen (s. Methode 7a) und der Einbau von [ $^3\text{H}$ ] Leucin ( $5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ;  $0.013 \text{ Ci}/\text{mMol}$ ) während 4 h gemessen (s. Methode 8a, 10a). Aus den restlichen Zellen wurden 42 h nach Stimulation Ribosomen isoliert (s. Methode 15) und die absolute Menge nach Warburg und Christian (1941) bestimmt (s. Methode 15).

Toxinzusatz zum Zellkultur- medium	[ $^3\text{H}$ ] Leucineinbau (IPM) 40 - 44 h nach Con A-Zugabe	Ribosomenfraktion	
		$\Delta E_{280}/\Delta E_{260} \text{ nm}$	RNA-Menge ( $\mu\text{g}$ ) pro $2 \times 10^8$ ein- gesäter Zellen
-	22 001 + 189 (100 %)	0.600	330 (100 %)
+ Ovalicin ( $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ )	11 968 + 553 (54 %)	0.601	168 (51 %)

c) Proteinsynthese kurz nach Mitogenzugabe

Die Proteinsynthese ist nicht der direkte Wirkort von Ovalicin. Ist die Reduktion der Proteinsynthese nur ein Nebeneffekt der Ovalicinwirkung oder ist die Hemmung des Translationsvorgangs ausreichend, um die DNA-Replikation im beobachteten Maße zu verhindern (vgl. Hartmann et al., 1978)? Durch genaue Analyse der Proteinsynthesehemmung will ich der Antwort auf diese Frage näherkommen.

a. Mitogenstimulation der Proteinsynthese

Ausgeruhete Lymphozyten (s. Methode 4a $\beta$ ) bauen bereits 2 Stunden nach Con A-Zugabe signifikant mehr [ $^3\text{H}$ ]Leucin in säureunlösliches, alkalistabiles Zellysat ein als unstimulierte Zellen (Fig. 28). Um diese Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, mußten die Milzzellen für die Pulsdauer in Leucin-armes Pulsmedium überführt werden (s. Methode 7b). Eine ähnlich frühe Zunahme der Leucineinbaurrate wird auch von Kay (1968) nach Phytohämagglutininzusatz zu peripheren Humanlymphozyten und von Hauser et al. (1978) bei Con A-stimulierten Rinder-Lymphknotenzellen beobachtet. Dieser erhöhte Einbau reflektiert wahrscheinlich eine Zunahme der Neusynthese von Proteinen<sup>+</sup>) und nicht eine zunehmende Sättigung des intrazellulären Leucinpools, da exogenes [ $^3\text{H}$ ]Leucin mit intrazellulärem Leucin in Lymphozyten rasch äquilibriert und die Aufnahmegeschwindigkeit und Poolgröße sich nach Stimulation kaum ändern (Ling und Kay, 1975; Peters und Hausen, 1971; Wettenhall und London, 1974). Mit fortschreitender Inkubationsdauer nimmt die Einbaurrate, gemessen in 2 stündigen [ $^3\text{H}$ ]Leucinpulsen, annähernd exponentiell im beobachteten Zeitraum zu. Unstimulierte Zellen zeigen dagegen ein konstante Einbaurrate (Fig. 28). Setzt man einer Parallelkultur mit dem Lektin  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin zu, so findet man nach 11 Stunden eine rund 15 % Hemmung des Leu-

---

<sup>+</sup>) Ein verringerter Proteinabbau kann durch diese Versuche nicht ausgeschlossen werden.

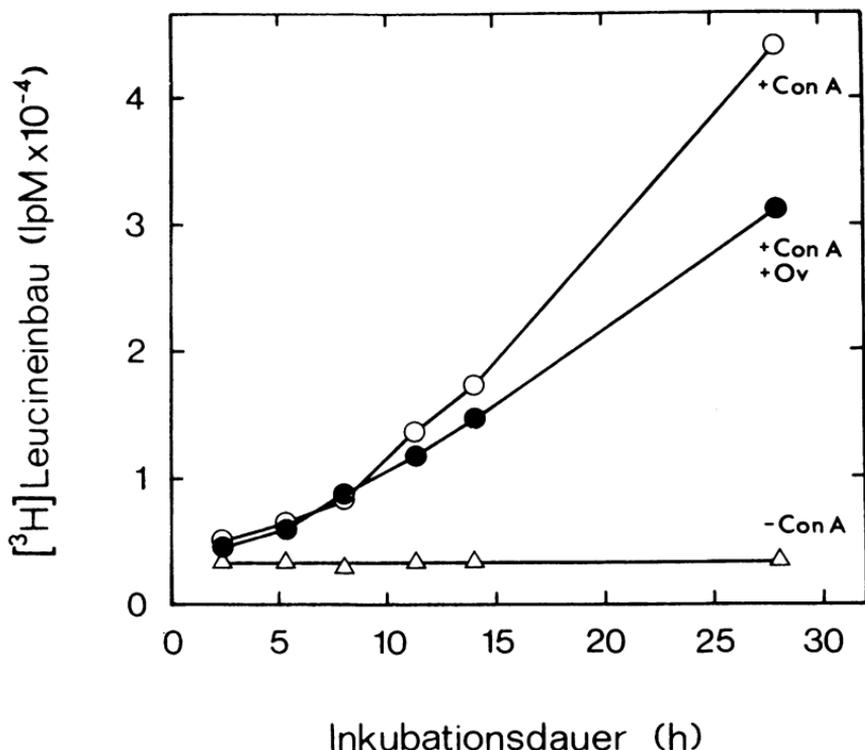


Fig. 28 Wirkung von Ovalicin auf die Stimulation der Proteinsynthese von Lymphozyten nach Con A-Zugabe

Jeweils  $40 \times 10^6$  Lymphozyten ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden nach 14 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Eine Kultur erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. Parallel dazu wurden Zellen ohne Mitogen und Hemmstoff inkubiert. 2 h vor den angegebenen Zeiten wurden den Suspensionen je  $2 \times 0.9$  ml Proben entnommen (s. Methode 7a), das Leucin haltige Medium abzentrifugiert (s. Methode 6) und 1 ml frisches Medium (ohne Leucin) mit  $5 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] Leucin zugesetzt (aus der ursprünglichen spezifischen Radioaktivität von  $58 \text{ Ci/mMol}$  resultierte bei Berücksichtigung des nach dem Dekantieren in den Röhrchen verbliebenen Restvolumens von ca.  $0.1$  ml und des Leucingehalts des Serums (s. Methode 7b) eine spezifische Radioaktivität von  $0.3 \text{ Ci/mMol}$ ). Zu den angegebenen Zeiten wurde der Einbau gestoppt und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode 8b $\beta$ ).

○ + Con A; ● + Con A, + Ovalicin, △ - Con A

cineinbaus (vgl. Tab. 9), die sich mit zunehmender Toxineinwirkungsdauer erhöht (Fig. 28).

Diese früh nach Mitogenstimulation gemessene Hemmung kann nicht durch Zugabe von Ovalicin während der Vorinkubationsphase (s. Methode 4a $\beta$ ) erhöht werden. Lymphozyten, die bereits 6 Stunden vor Con A-Zusatz  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin erhielten, zeigen nur eine geringe, wahrscheinlich nicht signifikante Zunahme der Proteinsynthesehemmung, gemessen am [ $^3$ H]Leucineinbau

Tab. 13 Einwirkung von Ovalicin während der Vorinkubation - Einfluß auf die Hemmung der Proteinsynthese

Jeweil  $33 \times 10^6$  Lymphozyten wurden nach 6 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A, 2-Mercaptoäthanol und gegebenenfalls in Gegenwart von Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M) in Medium mit 22 % des Normalgehalts an Leucin stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Zu einem Teil der Kulturen wurde Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M) bereits mit Beginn der Vorinkubation zugesetzt. Zu den in der Tab. angegebenen Zeiten wurden aus den jeweils doppelt angesetzten Kulturen je  $2 \times 0.9$  ml Proben entnommen (dies entspricht also 4 Parallelproben), für 2 h den Zellen/Probe 5  $\mu$ Ci [ $^3$ H]Leucin (resultierende spezifische Radioaktivität: 0.063 Ci/mMol) angeboten und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode 8b $\beta$ , 10a). Zur Berechnung der Hemmung s. Methode 21.

Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$ M) während der Vorinkubation anwesend	Hemmung der Proteinsynthese (%) [ $^3$ H]Leucinpuls (h nach Mitogenzugabe)	
	8 - 12	12 - 14
-	15.4 $\pm$ 1.4	33.8 $\pm$ 2.7
+	18.8 $\pm$ 2.0	34.1 $\pm$ 1.0

zwischen der 8. und 10. Stunde bzw. 12. und 14. Stunde nach Mitogenzugabe im Vergleich zu Zellen, denen das Toxin gleichzeitig mit Con A zugesetzt wurde (Tab. 13). Eine zu kurze

Einwirkungsdauer von Ovalicin, die nicht ausreicht, um eine genügende Menge an Toxin in die Zellen aufzunehmen, kann nicht die Ursache für die geringe Proteinsynthesehemmung sein (vgl. Kap. B2b).

β. Geschwindigkeit der Ovalicinwirkung auf den Leucineinbau zwischen der 12. und 14. Stunde nach Con A-Zugabe

Wie rasch tritt nun diese frühe Hemmung der Proteinsynthese auf? Um dies zu bestimmen, gibt man zu parallel angesetzten Lymphozytenkulturen zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Zusatz  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin, zu Kontrollzellen das gleiche Volumen BSS-Puffer (s. Material 3a). Um die Empfindlichkeit des Tests zu steigern, werden die Zellen zur Erhöhung der spezifischen Radioaktivität von [ $^3\text{H}$ ]Leucin in Leucin-armen Medium (22 % des Normalgehalts an Leucin) inkubiert. Dies hat keinen Einfluß auf die Zellstimulation (Tab. 1). 12 Stunden nach Mitogenzugabe wird innerhalb von 2 Stunden der [ $^3\text{H}$ ]Leucineinbau in Aliquots der Zellsuspensionen bestimmt. In Fig. 29 ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt: Bereits nach 2 stündiger Einwirkungsdauer beobachtet man eine geringe Hemmung. Eine rund 5 stündige Einwirkung von Ovalicin reicht zur maximal erzielbaren Hemmung - in diesem Fall 25 % - aus.

Die Proteinsynthese scheint jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt nach Mitogenzugabe gleich empfindlich gegenüber Ovalicin zu sein. Es zeigt sich eine im Vergleich zu früheren und späteren Ovalicinpulsen erhöhte Hemmung, wenn Ovalicin zwischen der 16. und 20. Stunde nach Mitogenzugabe einwirkt und der [ $^3\text{H}$ ]Leucineinbau während der letzten 2 Stunden des Toxinpulses gemessen wird (ohne Beleg).

γ. Analyse der früh synthetisierten Proteine (5. - 10. Stunde nach Mitogenzusatz)

Die Proteinsynthese kurz nach Mitogenstimulation wird - wenn auch nur maximal zu 20 - 30 % - vergleichsweise rasch gehemmt (Fig. 29; vgl. Fig. 18).

Zu den frühesten Effekten nach Lektinkontakt von Lymphozyten zählen selektive Phosphorylierung von nicht-Histon Chromatin-

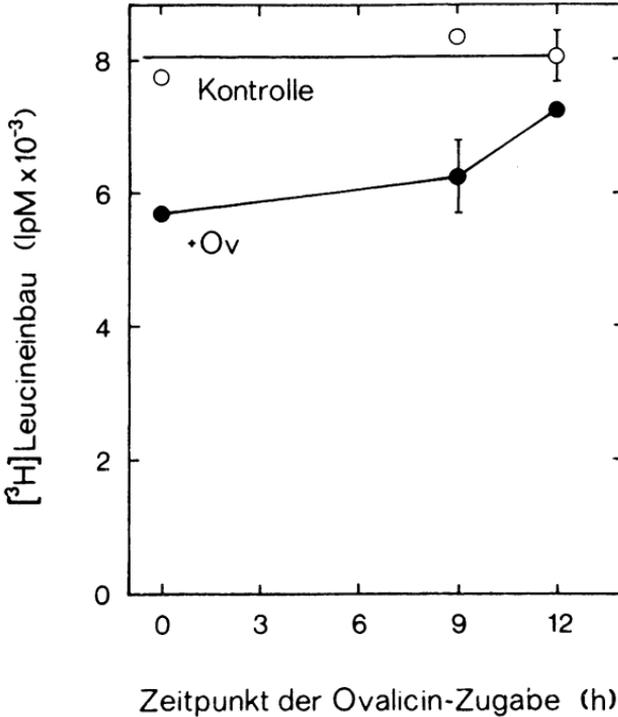


Fig. 29 Geschwindigkeit der Wirkung von Ovalicin auf die Proteinsynthese stimulierter Lymphozyten zwischen der 12. und 14. Stunde nach Con A-Zugabe

Jeweils  $7.7 \times 10^6$  Lymphozyten ( $1.75 \times 10^6/\text{ml}$ ) wurden nach 10 stündiger Vorinkubation in Medium mit nur 22 % des Normalgehalts an Leucin (s. Methode 7b) durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5} \text{ M}$ ) stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Zu den angegebenen Zeiten wurde in 20  $\mu\text{l}$  BSS (s. Material 3a) Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$  zugesetzt und vorsichtig umgeschwenkt. Die Kontrollen erhielten unter den gleichen Bedingungen 20  $\mu\text{l}$  BSS. 12 h nach Con A-Zugabe wurden je Kulturflasche  $2 \times 0.9 \text{ ml}$  Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a) und 5  $\mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]Leucin (resultierende spezifische Radioaktivität 0.063 Ci/mMol) zugesetzt (s. Methode 7b, c). Nach 2 h wurde die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode 8b $\beta$ ).

○ - Ovalicin (Mittelwerte aus 2 Proben pro Flasche)

● + Ovalicin (Mittelwerte aus je 2 Proben aus 2 parallel angesetzten Kulturen)

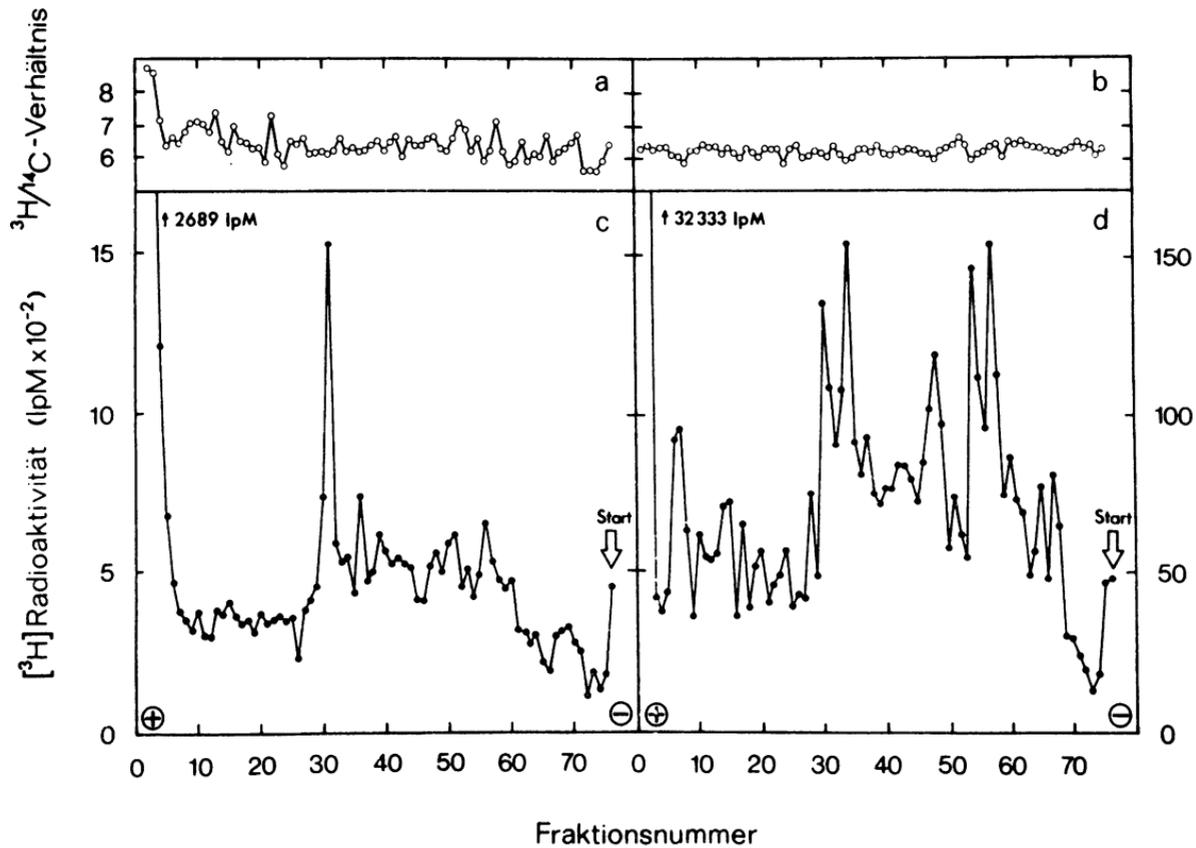
proteinen und deren Transport in den Kern (Johnson et al., 1974). Ähnlich früh - bereits 2 - 4 Stunden nach Mitogenkontakt - ist auch die bevorzugte Neusynthese dieser möglicherweise für die Genaktivierung verantwortlichen Proteine (Stott und Williamson, 1978) beobachtbar (Levy et al., 1973; Decker und Marchalonis, 1977).

Es ist nun denkbar, daß Ovalicin selektiv die Stimulierung der Synthese eines Proteins in der Frühphase nach Con A-Zugabe verhindert. Eine nur geringe Hemmung der Gesamtproteinsynthese wäre das Resultat, mit allerdings weitreichenden Folgen für die Proliferation der Zellen.

In Anlehnung an Decker und Marchalonis (1977) untersuchte ich mit Hilfe einer sehr sensitiven Doppelmarkierungstechnik diese Frage. 2 parallel angesetzte Milzzellkulturen wurden mit Con A versetzt, wobei eine Kultur zusätzlich  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin erhielt<sup>+</sup>). 5 Stunden später wurden neusynthetisierte Proteine durch Zugabe von [<sup>3</sup>H]Leucin (Kontrollkultur) bzw. [<sup>14</sup>C]Leucin (gehemmte Zellen) für weitere 5 Stunden markiert. Nach Ende des Pulses wurden beide Zellsuspensionen vereinigt, die radioaktiven Vorläufer ausgewaschen und aus den Lymphozyten Kern- und Zytoplasmafraktion gewonnen. Die Kerne und die konzentrierten Zytoplasmaproteine wurden in Natriumdodecylsulfat und 2-Mercaptoäthanol haltigem Puffer gelöst und die Proteine

---

<sup>+</sup>) Die Medien beider Kulturen waren leucinarm (Gehalt geringer als 1 % der Normalkonzentration von 52 mg/l). Um einen Einfluß der geringen Leucinmenge auf die Mitogenstimulation ausschließen zu können, wurde in Parallelansätzen mit hohem (78 % des Normalgehalts) und niedrigem (weniger als 1 % des Normalgehalts) Leucingehalt der [<sup>3</sup>H]Leucineinbau von unstimulierten und stimulierten Zellen mit und ohne Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M) zwischen der 9. und 11. h nach Con A-Zugabe gemessen. Die Zellen im leucinarmen Medium zeigen unabhängig von den Zusätzen einen rund 17 mal größeren Einbau von [<sup>3</sup>H]Leucin. Bei beiden Leucinkonzentrationen ergibt sich eine ähnliche Hemmung durch Ovalicin (11 bzw. 12 %; ohne Beleg). Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß trotz geringer Leucinkonzentration im Medium die Zellen wie bei Anwesenheit normaler Leucinmengen stimuliert werden (vgl. Tab. 1).



durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Plattengelen in Gegenwart von Dodecylsulfat nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele in kleine Streifen zerschnitten und die [ $^3\text{H}$ ] und [ $^{14}\text{C}$ ] Radioaktivität bestimmt. Nach Korrektur der Isotopenüberlappung (s. Methode 10b) wurden die [ $^3\text{H}$ ] und [ $^{14}\text{C}$ ] Impulse ins Verhältnis gesetzt ( $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ) und gegen die Mobilität aufgetragen. Bei selektiver Hemmung eines oder mehrerer Proteine durch Ovalicin erwartet man einen Anstieg des  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis in den Fraktionen, die diese(s) Protein(e) enthalten. In Fig. 30 ist das Ergebnis dieses Versuchs dargestellt. Das  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis weicht in keiner der Fraktionen um mehr als 10 % bei den Kernproteinen bzw. 20 % bei den Zytoplasmaproteinen vom Mittelwert ab. Daraus kann man folgern, daß die Synthese keines der Proteine der Kern- bzw. der Zytoplasmafraktion (soweit in der Gelelektrophorese aufgelöst) um mehr als 10 bzw. 20 % selektiv gehemmt ist. Die geringe Hemmung (vgl. Fußnote S. 113) prägt sich daher wahrscheinlich bei allen Proteinen gleich stark aus.

Fig. 30 Wirkung von Ovalicin auf die Synthese von Proteinen aus Kernen und Zytoplasma stimulierter Lymphozyten zwischen der 5. und 10. Stunde nach Con A-Zugabe

2 Ansätze mit jeweils  $8.8 \times 10^6$  Zellen wurden nach 13 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoethanol (s. Methode 4a $\beta$ ) in leucinarmen Medium (<1 % des Normalgehalts an Leucin; vgl. Methode 7b) stimuliert. 1 Kultur erhielt gleichzeitig mit Con A Ovalicin in einer Konzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. 5 h später wurde der Kontrollkultur 100  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] Leucin (Endkonzentration: 25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; resultierende spezifische Radioaktivität bei einem Leucingehalt des Serums von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 11  $\text{Ci}/\text{mMol}$ ; vgl. Methode 7b) und der Kultur mit Ovalicin 10  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ] Leucin (Endkonzentration: 2.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; resultierende spezifische Radioaktivität: 0.25  $\text{Ci}/\text{mMol}$ ) zugesetzt, nach weiteren 5 h die Zellsuspensionen vereinigt, Kerne und Kernüberstand gewonnen (s. Methode 13a $\beta$ ) und deren Proteine in einem 10 % Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengel getrennt (s. Methode 9a). Das Gel wurde zerschnitten und die [ $^3\text{H}$ ]- und [ $^{14}\text{C}$ ] Radioaktivität jeder Fraktion bestimmt (s. Methode 10b).

- a)  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der Zytoplasmaproteine
- b)  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der Kernproteine
- c) Zytoplasmaproteine
- d) Kernproteine

d) Einfluß auf die Proteinsynthese 30 - 36 Stunden nach Mitogenzusatz

α. Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin

Im Abschnitt 3a wurde bereits die unterschiedliche Hemmbarkeit der Proteinsynthese nach kurzer und langer Ovalicineinwirkung beschrieben (vgl. Tab. 9). Die 20 - 30 % Hemmung des Leucineinbaus, gemessen zwischen der 12. - 14. Stunde nach Lektinzusatz, wird innerhalb von 4 - 5 Stunden nach Ovalicinzugabe beobachtet (Fig. 29). Wie lange muß Ovalicin im Medium anwesend sein, um die im Vergleich zu frühen Zeiten nach Mitogenzusatz erhöhte Hemmung zwischen der 30. und 36. Stunde zu erreichen?

Versetzt man zu verschiedenen Zeitpunkten nach Con A-Zugabe eine Milzzellkultur mit Ovalicin ( $2 \times 10^{-7} M$  Endkonzentration) und bestimmt die Proteinsynthese im Zeitraum zwischen der 30. und 36. Stunde in jeweils 2 stündigen [ $^3H$ ]Leucinpulsen, so findet man, daß erst nach einer Mindesteinwirkdauer des Toxins von rund 24 Stunden, vom Pulsende gerechnet, eine Hemmung von 40 - 50 % auftritt (Fig. 31). Wirkt Ovalicin weniger als 24 Stunden auf die Lymphozyten, so wird eine Hemmung von maximal 20 % erreicht. Der Übergang zwischen der niedrigen und höheren Hemmung erfolgt innerhalb eines Intervalls von 2 - 4 Stunden. Der Zeitpunkt der verhältnismäßig raschen Zunahme der Hemmung scheint direkt proportional zum Pulszeitpunkt zu sein (Fig. 31).

β. Einfluß auf die Synthese einzelner Proteine oder Proteingruppen

Die Hemmung der Proteinsynthese erhöht sich zu einer Zeit rasch zunehmender DNA-Synthese (24 - 36 Stunden nach Mitogenzugabe; vgl. Fig. 28). Kann die erhöhte Hemmung des Leucineinbaus durch die Reduktion der DNA-Synthese zustandekommen? Wie in der Einführung zu Abschnitt 3 dargestellt wurde, sind DNA- und Proteinsynthese wahrscheinlich über die Biosynthese der Histone miteinander verknüpft. In diesem Fall sollte man eine selektive Hemmung der Histonsynthese erwarten.

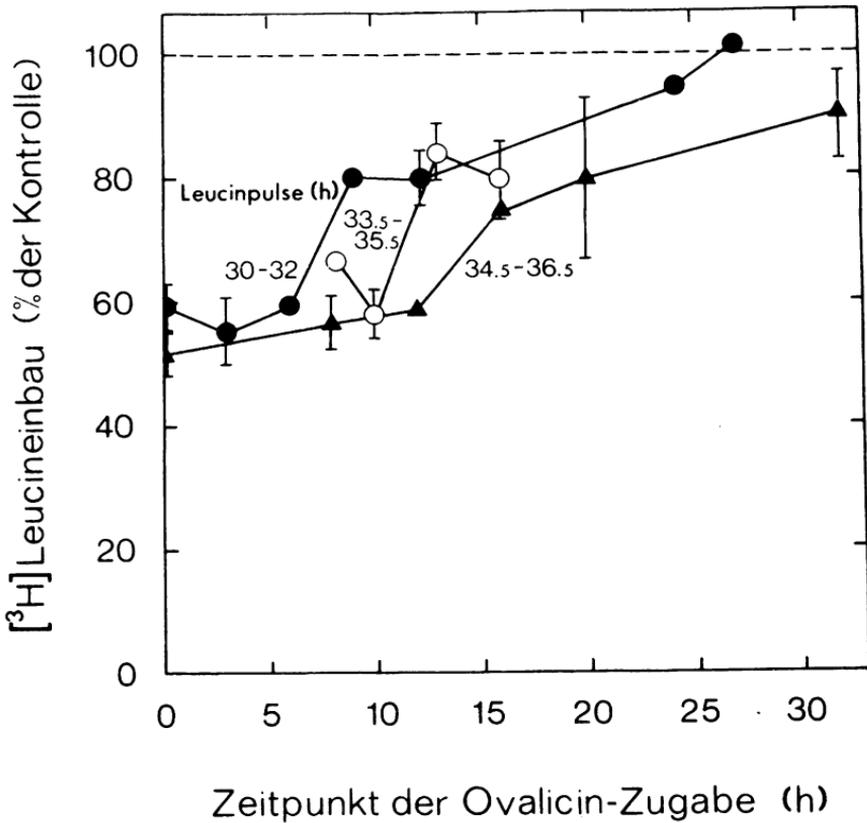


Fig. 31 Wirkung von Ovalicin auf die Proteinsynthese stimulierter Lymphozyten 30 - 36 Stunden nach Con A-Zusatz in Abhängigkeit des Zeitpunkts seiner Zugabe

Jeweils  $8.8 \times 10^6$  Zellen wurden nach rund 12 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoäthanol in Normalmedium (●) bzw. in Medium mit 22 % des Normalgehalts an Leucin (○,▲) stimuliert (s. Methode 4aβ). Zu den angegebenen Zeiten wurde in 20  $\mu$ l BSS (s. Material 3a) Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M zugesetzt. Zu den Kontrollen wurde unter gleichen Bedingungen 20  $\mu$ l BSS pipettiert (●: nur 1 Kontrollkultur  $t = 0$ ). 30 h (●), 33.5 h (○) bzw. 34.5 h (▲) wurden je Kulturflasche 2 x 0.9 ml Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a) und der Einbau von [<sup>3</sup>H]Leucin (5  $\mu$ Ci/ml; resultierende spezifische Radioaktivität: (●) 0.013 Ci/mMol bzw. (○,▲) 0.063 Ci/mMol) während 2 h in säureunlösliches Zellysate bestimmt. Zur Berechnung der Restaktivitäten wurden die entsprechenden Kontrollwerte verwendet (s. Methode 21). Bei einem Ansatz (●) wurde nur ein einzelner 100 %-Wert zur Berechnung verwendet werden (Fortsetzung der Legende s. nächste Seite).

100 %-Werte	[ <sup>3</sup> H]Leucinpuls
( ) Zahl der Wertepaare	(h nach Stimulation)
● 7 956 ± 188 IpM (1)	30 - 32
○ 32 523 ± 3 277 IpM (4)	34.5 - 36.5
▲ 46 333 ± 3 015 IpM (6)	33.5 - 35.5

Zur Untersuchung der Umsatzrate (Synthese und Abbau) einzelner Lymphozytenproteine oder Proteingruppen wurden Kontrollzellen und Zellen mit  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Zugabe mit [<sup>14</sup>C]Leucin während 4 Stunden markiert<sup>+</sup>). Die Zellen wurden anschließend lysiert, ihre Proteine nach dem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen in Gegenwart von Dodecylsulfat zumindest teilweise aufgetrennt und deren Radioaktivität durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (Fig. 32). Man beobachtet, wie erwartet, einen Anstieg der radioaktiven Markierung der Proteine von gehemmten und ungehemmten Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer (vgl. Fig. 28). Überproportional nimmt der Einbau in die Fraktion sehr kleiner Proteine (wahrscheinlich Histone) zu (vgl. Levy et al., 1973). Vergleicht man die Bandenmuster der Dodecylsulfatlysate Ovalicin-behandelter Zellen und Kontrollzellen, so findet man die Markierung fast aller Proteine bzw. Proteingruppen annähernd gleichmäßig reduziert<sup>++</sup>) (Hartmann et al., 1978).

---

<sup>+</sup>) Zur Kontrolle der Ovalicinwirkung wurde der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau (1 µCi/ml; 6.7 Ci/mMol) in säureunlösliches Zellysate zwischen der 36. und 42. h nach Mitogenzusatz bestimmt. Die Hemmung durch Ovalicin betrug in diesem Experiment 44 % (ohne Beleg).

<sup>++</sup>) Die einzelnen Proben dürfen nicht streng quantitativ ausgewertet werden, da bei ihrer Gewinnung an den Zellen nicht exakt die gleiche Menge Waschpuffer hängen blieb. Somit ergab sich ein leicht variables, unbekanntes Probenvolumen der Lysate.

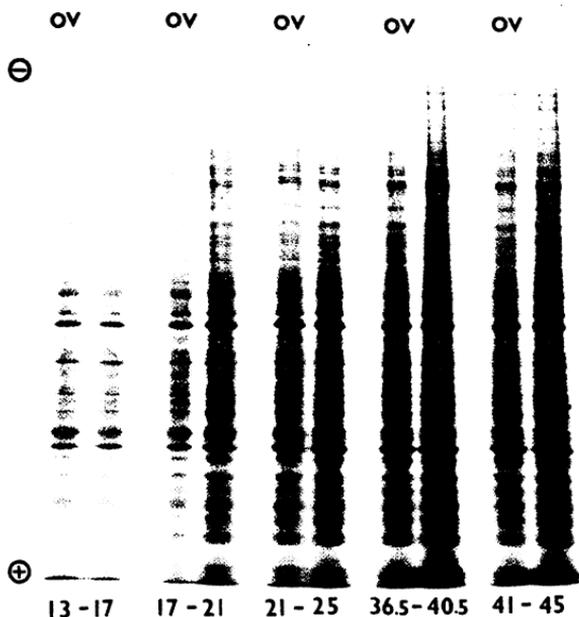


Fig. 32 Wirkung von Ovalicin auf die Synthese einzelner Proteine ganzer Milzzellen zu verschiedenen Zeiten nach Con A-Zugabe

2 Ansätze mit je  $100 \times 10^6$  Zellen wurden ohne Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $2 \mu\text{g/ml}$ ) in Abwesenheit von 2-Mercaptoäthanol in Medium mit 5 % fötalem Kälberserum stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ; Material 3a); 1 Kultur erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin in einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5}$  M. Zu Beginn der angegebenen Intervalle wurden Proben entnommen (s. Methode 7a) und die Zellen vom Leucin-haltigen Medium freigewaschen (s. Methode 6). Anschließend wurde 1 ml frisches Medium (ohne Leucin) mit den entsprechenden Zusätzen und  $1 \mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Leucin (resultierende spezifische Radioaktivität:  $0.11 \text{ Ci/mMol}$ ) zugesetzt (s. Methode 7b), die Zellen nach 4 h geerntet (s. Methode 9a), die markierten Proteine in einem Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Plattengel (Acrylamidgradient: 5 - 15 %) aufgetrennt (s. Methode 9b) und das Gel autoradiographiert (s. Methode 11a). Dauer der Autoradiographie: 7 Tage.

Möglicherweise wird die oben erwähnte Fraktion niedermolekularer Proteine etwas stärker gehemmt. Diese wahrscheinlich nur gering bevorzugte Hemmung reicht allerdings nicht aus für die Verdopplung der Proteinsynthesehemmung rund 30 - 36 Stunden nach Lektinzugabe im Vergleich zu Messungen ungefähr 20 Stunden früher (vgl. Tab. 9). Sicher sind alle Proteine von der zunehmenden Reduktion durch Ovalicin betroffen. Wie die Untersuchung der DNA-Synthese im zellfreien System spricht dieser Versuch gegen eine direkte Hemmung der DNA-Synthese durch Ovalicin, da in diesem Fall, wie bei Inhibitoren der DNA-Synthese, selektiv die Biosynthese der Histone unterdrückt werden müßte (vgl. dazu Richter, 1977).

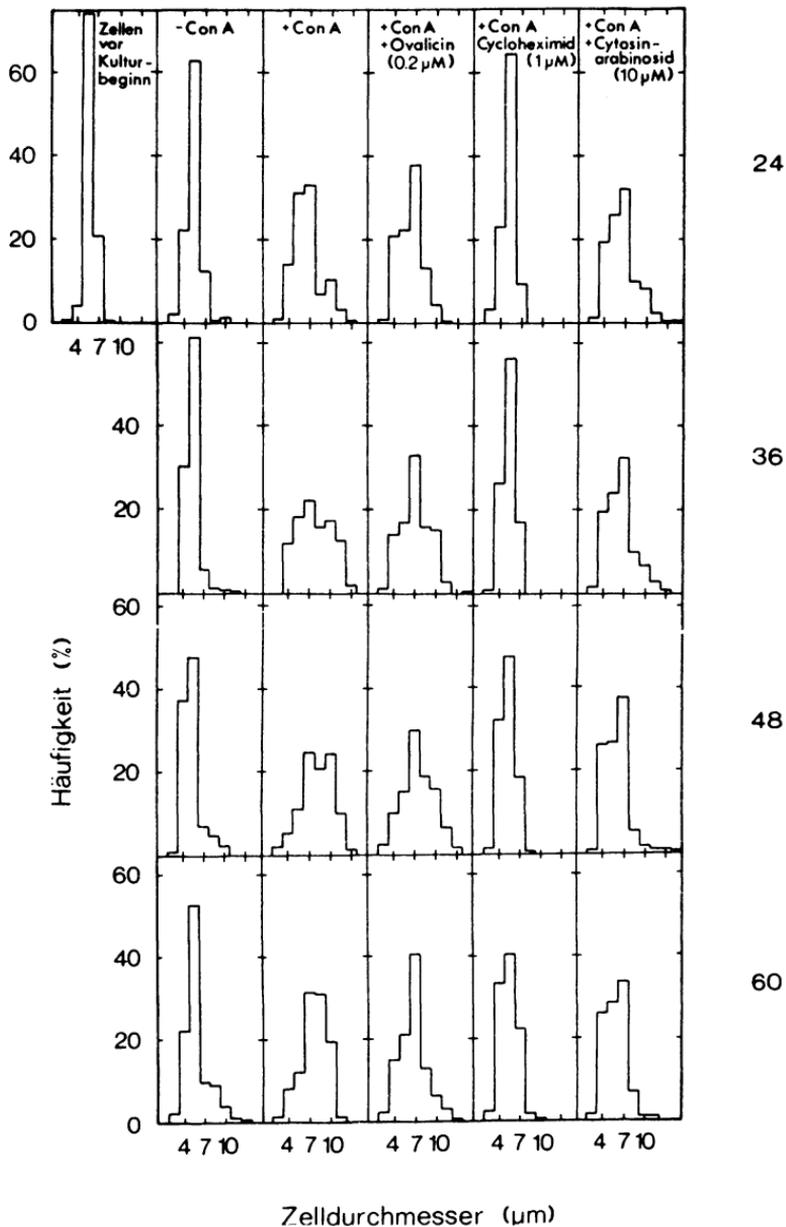
#### 4. Vergleich mit Hemmstoffen der Protein- und DNA-Synthese

In den letzten zwei Abschnitten konnte ich zeigen, daß Ovalicin weder die DNA- noch die Proteinsynthese direkt hemmt. Diese Befunde werden unterstützt durch den Vergleich der Wirkung von Cycloheximid und Cytosinarabinosid auf die Differenzierung des kleinen ruhenden Lymphozyten zur großen Blastzelle (vgl. Kap. B1b). Cycloheximid hemmt die eukariotische Translation, indem es mit dem Ribosom in Wechselwirkung tritt (vgl. Richter, 1977); Cytosinarabinosid, ein Desoxyribonukleosid-Analog, stört wahrscheinlich die Replikation durch selektive Hemmung der Initiation der DNA-Synthese (Friedland, 1977).

Zur Analyse der Blastzellbildung erhielten identisch angesetzte Lymphozytenkulturen, neben einer optimalen Dosis Con A und 2-Mercaptoäthanol,  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin bzw.  $1 \times 10^{-6}$  M Cycloheximid oder  $1 \times 10^{-5}$  M Cytosinarabinosid. Als Kontrollen dienten Zellen mit und ohne Con A-Zusatz bzw. frisch isolierte Lymphozyten. Zu unterschiedlichen Zeiten nach Versuchsbeginn wurden den Zellsuspensionen Proben entnommen und die Zellen für die mikroskopische Bestimmung des Zelldurchmessers in Agarose eingebettet und fixiert.

Frisch isolierte Zellen zeigen eine vergleichsweise scharfe Größenverteilung. Die meisten Zellen haben einen Durchmesser zwischen 5.5 und 6.5  $\mu\text{m}$  und der Anteil an Blastzellen liegt unter 1 % (Fig. 33). Diese Werte entsprechen ziemlich genau dem mittleren Durchmesser von unstimulierten Rattenthymozyten, den Aisenberg und Murray (1971) zu 6  $\mu\text{m}$  bestimmten. 'Unstimulierte' Zellen, die nur  $10^{-5}$  M 2-Mercaptoäthanol erhielten, haben im Durchschnitt einen ähnlichen Durchmesser (nach 24 stündiger Inkubation). Nach längerer Inkubation tritt jedoch eine geringe Anzahl von Blastzellen (Definition s. Fußnote S. 88) auf (Fig. 33, 34). Dies manifestiert sich auch in einer erhöhten Einbaurrate von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin (Fig. 35). Danach scheint 2-Mercaptoäthanol schwach mitogen zu wirken (vgl. Goodman und Weigle, 1977; Lemke und Opitz, 1976; Opitz et al., 1978). Durch Mitogenzusatz bilden sich bereits nach 24 Stunden eine große Anzahl Blastzellen (20 %), deren Anteil nach weiteren 24 Stunden auf über 50 % ansteigt (Fig. 33, 34). Eine ähnliche Beobachtung publizierten Wang und Mitarbeiter für

Zellernte  
(h)



Con A-stimulierte menschliche Blutlymphozyten. (Wang et al., 1975). Die geringe Abnahme der Blastenzahl<sup>+</sup>), die zur 60. Stunde gemessen wurde, könnte auf die Bildung kleiner Tochterzellen zurückzuführen sein (Fig. 33, 34; vgl. auch Fig. 15). In Gegenwart von Cycloheximid bleiben die Lymphozyten in ihrer Größe weitgehend unverändert erhalten und ähneln dabei den 'unstimulierten' Kontrollzellen (Fig. 33); bei ihnen ist jedoch selbst die geringe Blastzellbildung praktisch vollständig unterdrückt (Fig. 36). Offensichtlich ist kontinuierliche Proteinsynthese unabdingbare Voraussetzung für die Differenzierung zur Blastzelle. In den Proben mit Cytosinarabinosid findet man 24 Stunden nach Con A-Zugabe eine fast identische Häufigkeit der einzelnen Größenklassen wie ohne den spezifischen Inhibitor der DNA-Synthese (Fig. 33). Dies stimmt mit den Befunden von Andersson und Melchers (1974) überein, die sie bei Hemmung von Lipopolysaccharid stimulierten Milzzellen aus thymuslosen Mäusen erhielten (vgl. auch Janossy et al., 1976). Im Gegensatz zu stimulierten B-Zellen (Andersson und Melchers, 1974) nimmt der Anteil der Blastzellen bei Cytosinarabinosid behandelten Milzzellen nicht mehr zu, sondern fällt

---

<sup>+</sup>) Es ergeben sich praktisch identische Ergebnisse, wenn man statt der Anzahl Blastzellen den mittleren Durchmesser der Zellen als Maß für die Transformation nimmt (Hartmann et al., 1978).

Fig. 33 Einfluß von Ovalicin, Cycloheximid und Cytosinarabinosid auf die Kinetik der Blastzellbildung Con A stimulierter Lymphozyten. - Häufigkeit verschiedener Größenklassen

Jeweils  $33 \times 10^6$  Zellen wurden nach rund 13 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoäthanol stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Gleichzeitig mit dem Mitogen erhielten verschiedene Kulturen entweder Ovalicin (Endkonzentration: 0.2  $\mu$ M), Cycloheximid (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) oder Cytosinarabinosid (Endkonzentration: 10  $\mu$ M) in BSS-Puffer (s. Material 3a). Eine parallel angesetzte Kultur blieb ohne Hemmstoffe, eine ohne Con A. Zu den angegebenen Zeiten wurden den Ansätzen Proben entnommen (s. Methode 7a), die Zellen in Agarose eingebettet und fixiert (s. Methode 16a). Es wurden die Durchmesser von jeweils 250 Zellen bestimmt (s. Methode 16b) und in Größenklassen geordnet.

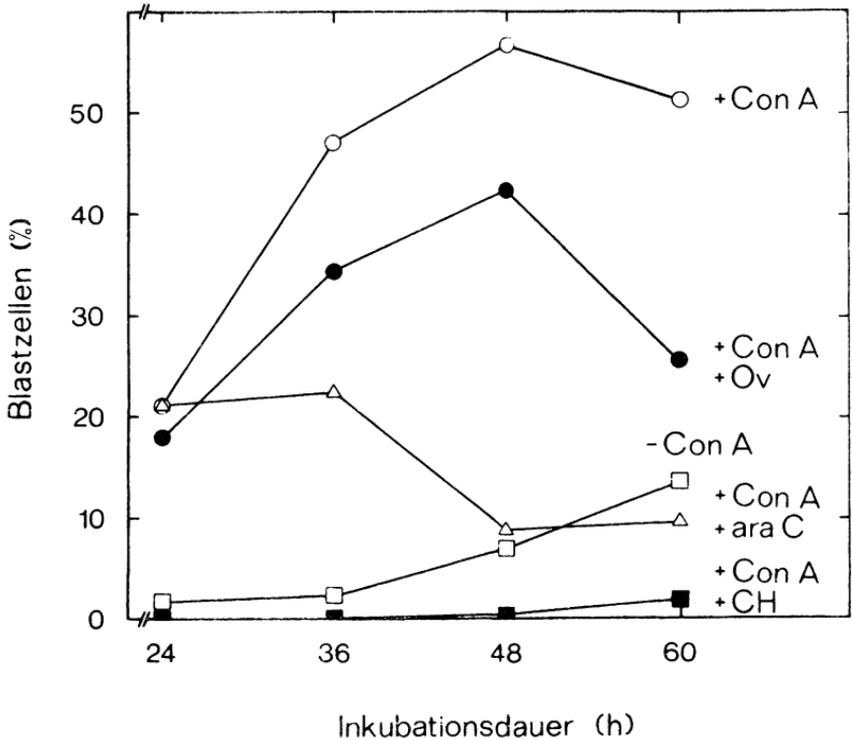
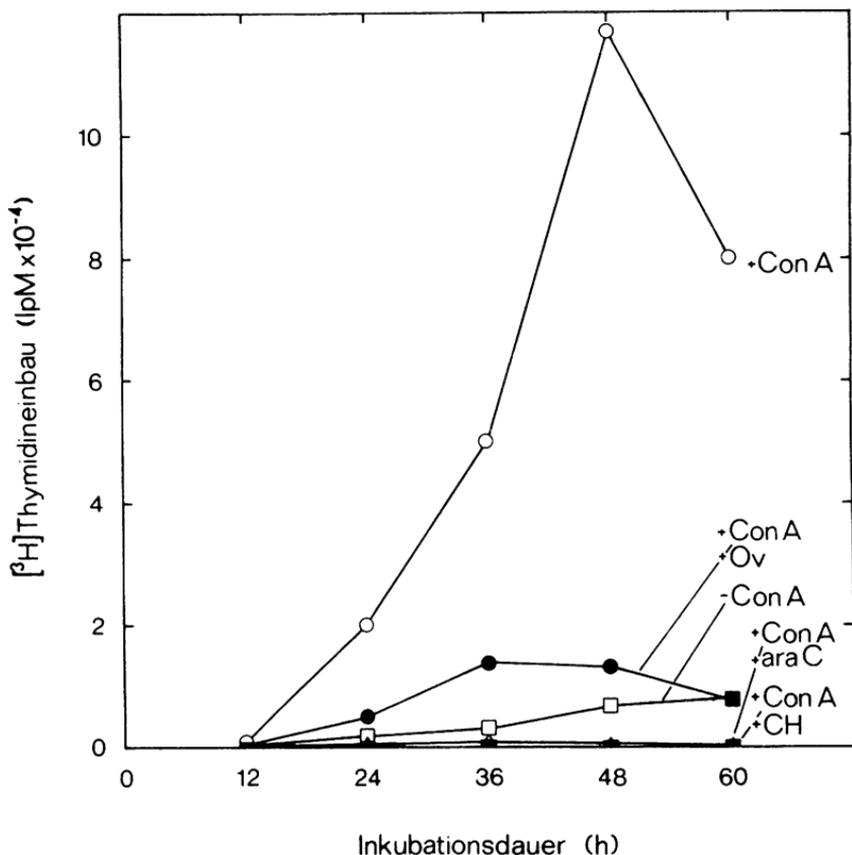


Fig. 34 Einfluß von Ovalicin, Cycloheximid und Cytosinarabinosid auf die Kinetik der Blastzellbildung Con A-stimulierter Lymphozyten

Die Werte stammen aus dem in Fig. 33 dargestellten Experiment. Zellen mit einem Durchmesser  $\geq 8 \mu\text{m}$  werden definitionsgemäß als Blastzellen bezeichnet, da diese Größenklasse in unstimulierten Zellen praktisch nicht vorkommt (vgl. Fig. 33 und Methode 16b).

- + Con A
- + Con A, + Ovalicin ( $0.2 \mu\text{M}$ )
- △ + Con A, + Cytosinarabinosid ( $10 \mu\text{M}$ )
- + Con A, + Cycloheximid ( $1 \mu\text{M}$ )
- - Con A

sogar nach 36 Stunden wieder ab (Fig. 34). Daraus resultiert eine starke Hemmung der Blastzellbildung (Fig. 36), wahrscheinlich durch selektives Absterben großer Zellen (mikroskopische Beobach-



**Fig. 35 Einfluß von Ovalicin, Cycloheximid und Cytosinarabinosid auf die Kinetik des Thymidineinbaus Con A-stimulierter Lymphozyten**

Versuchsdurchführung s. Fig. 33. 1 h vor den angegebenen Zeiten wurden aus jedem Ansatz Proben entnommen (s. Methode 7a) und der Einbau von  $[^3\text{H}]$ Thymidin (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; 0.5 Ci/mMol; 1 h) in säureunlösliches Zellysate bestimmt (s. Methode 8a $\beta$ , 10a).

- + Con A
- + Con A, + Ovalicin (0.2  $\mu\text{M}$ )
- △ + Con A, + Cytosinarabinosid (10  $\mu\text{M}$ )
- + Con A, + Cycloheximid (1  $\mu\text{M}$ )
- - Con A

tung ohne Beleg). Dieser Versuch legt nahe, daß für die Blastzellbildung nach der 24. Stunde DNA-Synthese nötig ist. Wie schon kurz in Kapitel B beschrieben, unterscheidet sich die Wirkung von Ovalicin auf die Bildung von Blastzellen deutlich von der Wirkung

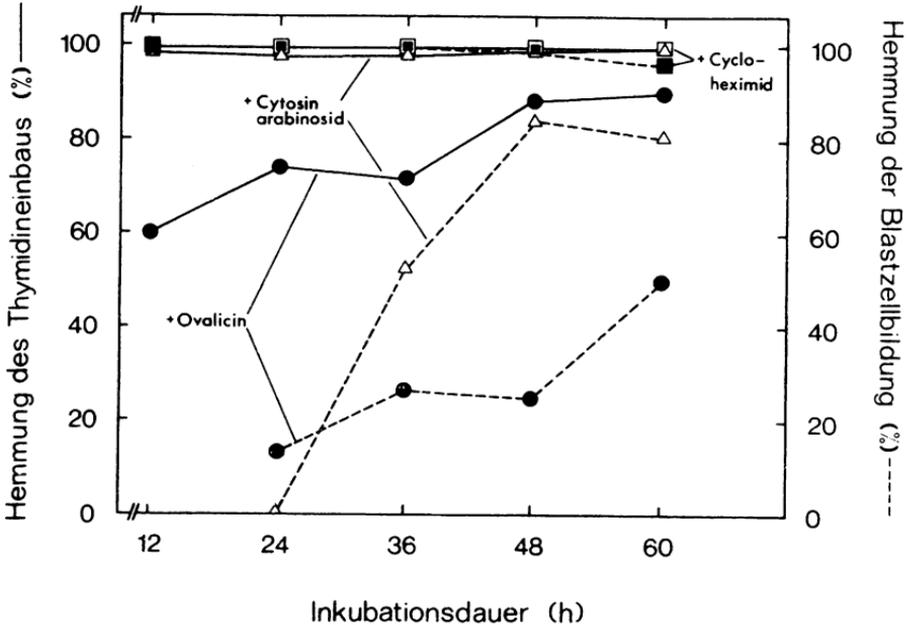


Fig. 36 Einfluß von Ovalicin, Cycloheximid und Cytosiarabinosid auf die Kinetik der Blastzellbildung Con A-stimulierter Lymphozyten. - Vergleich der Hemmung von Thymidineinbau und Blastzellbildung

Die Werte wurden aus Fig. 34 und Fig. 35 berechnet. Die 100 %-Werte lieferten die stimulierten Kontrollen ohne Hemmstoff.

- + Con A, + Ovalicin (0,2  $\mu$ M)
- △ + Con A, + Cytosinarabinosid (10  $\mu$ M)
- □ + Con A, + Cycloheximid (1  $\mu$ M)
- Hemmung der Blastzellbildung (%)
- Hemmung des Thymidineinbaus (%)

der beiden anderen Toxine. In Gegenwart von Ovalicin werden Blastzellen noch bis 48 Stunden nach Hemmstoffzugabe in fast gleicher Anzahl wie bei ungehemmten Kulturen gebildet (Fig. 34). Die geringe Hemmung der Blastzellbildung steht im augenfälligen Kontrast zur starken Reduktion der DNA-Synthese (Fig. 35, 36). Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Größenklassen Ovalicin behandelte Zellen zeigt eine Besonderheit. Im Gegensatz zu Zellen ohne Hemmstoff bleibt, trotz ähnlicher Verbreiterung der Größenverteilung, unabhängig vom Meßzeitpunkt eine 'Zellpopulation' mittlerer Größe (Durchmesser 7.5  $\mu\text{m}$ ) erhalten (Fig. 33; Fig. 14). Möglicherweise handelt es sich dabei um Zellpopulationen, die in Gegenwart von Ovalicin auf einer niedrigen Differenzierungsstufe festgehalten werden. Anschließend fällt der Anteil großer Zellen rasch ab. Dies läuft parallel mit dem Auftreten von polynuklearen Zellen und Zellen mit sich auflösender Zellmembran, neben wenigen intakten Lymphozyten (mikroskopische Beobachtung ohne Beleg). Ovalicin scheint danach bei längerer Einwirkung zytotoxisch zu wirken. Diese Beobachtungen zeigen, daß der Wirkungsmechanismus von Ovalicin völlig anders ist, wie der von Inhibitoren der Protein- und DNA-Synthese.

## 5. Polyaminsynthese

Da die Synthese von Protein- und DNA-Synthese nicht unmittelbar gehemmt wird (vgl. Kap. C2,3,4) besteht die Möglichkeit, daß beide, für die Proliferation der Zellen zentralen Prozesse über eine Reaktion beeinflusst werden, die nach Ausschaltung durch Ovalicin parallel oder sequenziell Protein- und DNA-Synthese inhibiert. Bei der Komplexität und der engen Verknüpfung der Stoffwechselreaktionen in eukariotischen Zellen gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten in das feinregulierte Netzwerk einzugreifen, um letzten Endes DNA-Synthese und damit Zellvermehrung zu unterbinden (vgl. Ling und Kay, 1975).

Eng verbunden mit dem Übergang vom Ruhezustand zur raschen Proliferation vieler Zellsysteme ist die starke Akkumulation von Polyaminen, deren Funktion allerdings heute noch weitgehend im Dunkeln liegen (Tabor und Tabor, 1976). So steigen die Aktivitäten der beiden Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese - Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase - nach Mitogenstimulation in Lymphozyten innerhalb weniger Stunden nach Lektinzugabe stark an (Kay und Lindsay, 1973), was eine Anhäufung von Putrescin, Spermidin und Spermin zur Folge hat (Fillingame und Morris, 1973).

Bei spezifischer Hemmung der Polyaminsynthese durch Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon)<sup>+</sup> oder  $\alpha$ -Methylornithin<sup>+</sup> zeigen eukariotische Zellen ähnliche Symptome wie bei Ovalicinwirkung. Einige Ähnlichkeiten in der Expression der Hemmung seien aufgeführt:

Die Ausprägung der Proliferationshemmung nach Inhibierung der Polyaminsynthese, gemessen am [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau ist langsam und erfolgt im Extremfall - insbesondere bei nicht lymphoiden

---

<sup>+</sup>) Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon) hemmt die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (Williams-Ashman und Schenone, 1972). Damit wird die Übertragung einer Aminopropyl-Gruppe auf Putrescin ( $H_2NCH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ ) bzw. Spermidin ( $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$ ) verhindert, sodaß weder Spermidin noch Spermin gebildet werden können. Durch kompetitive Hemmung von Ornithin-Decarboxylase durch  $\alpha$ -Methylornithin wird die Bildung von Putrescin (1,4-Diaminobutan) unterdrückt (Mamont et al., 1976).

Tab. 15 Einfluß von Ovalicin auf die Ornithin-Decarboxylaseaktivität im zellfreien Extrakt Con A stimulierter Lymphozyten

Ansätze mit  $100 \times 10^6$  Zellen wurden nach 12 stündiger Vorinkubation mit Con A und 2-Mercaptoäthanol versetzt (s. Methode 4a $\beta$ ). 12 h nach Mitogenzugabe wurden die Zellen geerntet, der 100 000 x g Überstand gewonnen (s. Methode 17a) und die Ornithin-Decarboxylaseaktivität durch Freisetzung von  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  aus DL- $[1-^{14}\text{C}]$  Ornithin während 1 h bei 37°C in Gegenwart verschiedener Zusätze bestimmt (s. Methode 17b). Der Wert ohne Zellextrakt wurde aus Fig. 5a extrapoliert. In den Klammern ist die Zahl der Parallelproben angegeben.

Zusätze	$[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ -Bildung aus $[1-^{14}\text{C}]$ Ornithin (IpM)
- Zellextrakt	85
Kontrolle	656 $\pm$ 19 (3)
0.17 ( $\mu\text{M}$ )	603 (1)
+ Ovalicin 20 ( $\mu\text{M}$ )	613 (1)
+ S49.1-Kulturüberstand	546 $\pm$ 80 (2)
+ Ovalicin aus S49.1-Kulturüberstand (0.17 $\mu\text{M}$ )	573 $\pm$ 114 (2)

Zellen, nicht während des ersten Zellzyklus (Rupniak und Paul, 1978a, b); Mamont et al., 1976; vgl. Kap. B1a und B2a).

Die DNA-Synthese in Lymphozyten wird durch Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon) nur unvollständig gehemmt. Auf die laufende DNA-Replikation hat der Inhibitor der Spermidin- und Sperminbiosynthese keinen Einfluß (Fillingame et al., 1975; Otani et al., 1974; vgl. Kap. A3, B1).

Die RNA-Synthese in Lymphozyten wird durch Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon) nicht oder nur geringfügig beeinflusst (Kay und Pegg, 1973; Fillingame und Morris, 1973); vgl. Kap. C6).

Die Blastzellbildung bei Lymphknotenzellen, 24 Stunden nach Con A-Zugabe, wird nicht durch Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon) verhindert (Fillingame und Morris, 1973; vgl. Kap. B1b und C4).

Tab. 16 Einfluß von Ovalicin auf die S-Adenosylmethionin-Decarboxylaseaktivität im zellfreien Extrakt Con A-stimulierter Lymphozyten

Zellstimulation, Ernte und Gewinnung des 100 000 x g Überstands wie in Tab. 15 beschrieben. Die S-Adenosylmethionin-Decarboxylaseaktivität wurde durch Freisetzung von [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> aus S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]methionin während 1 h bei 37°C in Gegenwart verschiedener Zusätze bestimmt (s. Methode 17c). In den Klammern ist die Zahl der Parallelproben angegeben.

Zusätze	Bildung von [ $^{14}\text{C}$ ]CO <sub>2</sub> aus S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]-methionin (IpM)
- Zellextrakt	169 ± 8 (3)
Kontrolle	596 ± 27 (2)
+ Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon)	253 (1)
0.17 (µM)	539 ± 32 (2)
+ Ovalicin 20 (µM)	558 ± 52 (2)

Aufgrund dieser Ähnlichkeiten in den Hemmeffekten von Polyaminsyntheseinhibitoren erschien es mir naheliegend die Wirkung von Ovalicin auf die beiden Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese zu untersuchen.

Dazu wurden aus Con A-stimulierten Mäusemilzzellen 12 Stunden nach Lektinzugabe durch hochtourige Zentrifugation der Lymphozytenlysate Zellextrakte gewonnen. In ihnen kann mit Hilfe geeigneter markierter [ $^{14}\text{C}$ ]Substrate die Aktivität von Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase durch Messung des freigesetzten [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> bestimmt werden, das in einer alkalischen Lösung absorbiert wurde (Insel und Fenno, 1978). Ornithin-Decarboxylase, wie auch S-Adenosylmethionin-Decarboxylase zeigen eine im Vergleich zu den Proben ohne Zellextrakt deutlich meßbare Aktivität (Tab. 15, 16; vgl. auch Fig. 37). Gibt man nun zu parallelen Ansätzen Ovalicin, so findet man selbst bei einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5}$  M keine signifikante Reduktion der [ $^{14}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub>-Freisetzung bei beiden Enzymtests (Tab. 15, 16). Auch Ovalicin, das mit S49.1-Zellen inkubiert wurde, um eine mögliche metabolische Aktivierung zu erreichen, ist in einer Konzentration von 0.17  $\mu\text{M}$  im Ornithin-Decarboxylase-Test unwirksam (Tab. 15).  $1 \times 10^{-5}$  M Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon), ein spezifischer Hemmstoff der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (Williams-Ashman und Schenone, 1972), hemmen unter gleichen Bedingungen das Aminopropylgruppenübertragende Enzym zu mehr als 80 % (Tab. 16; vgl. Kay und Pegg, 1973).

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine direkte Beeinflussung von Ornithin- und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase durch Ovalicin.

Als weitere Möglichkeit des Eingriffs in die für die proliferierende Zelle benötigte Polyaminsynthese könnte die Expression der Schlüsselenzyme durch Ovalicin verhindert werden. Stellvertretend wurde der Einfluß von Ovalicin auf die Neusynthese der Ornithin-Decarboxylase, die wahrscheinlich für die Aktivitätszunahme dieses Enzyms nach Mitogenstimulation ausschlaggebend ist (Tabor und Tabor, 1976), zu unterschiedlichen Zeiten nach Con A-Zugabe untersucht. In den ersten 4 Stunden nach Mitogenkontakt ist keine Ornithin-Decarboxylaseaktivität nachweisbar. Schon kurz

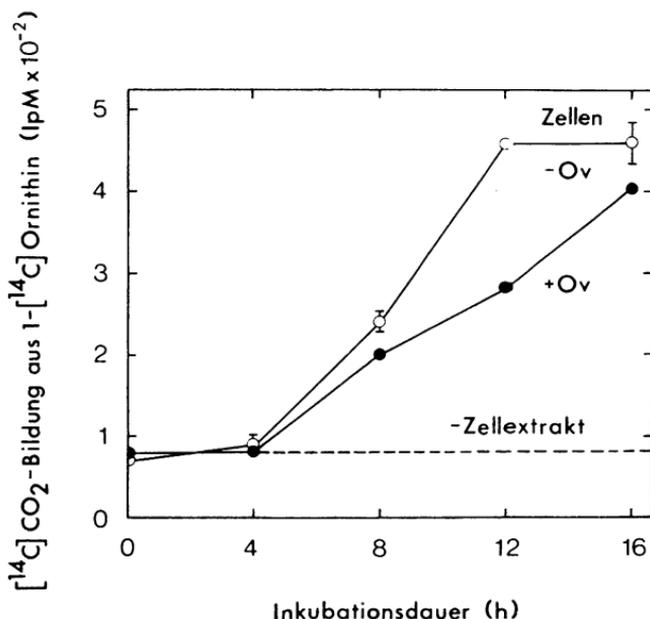


Fig. 37 Einfluß von Ovalicin auf die Stimulation der Ornithin-Decarboxylaseaktivität in Lymphozyten nach Con A-Zugabe

Ansätze mit je  $33 \times 10^6$  Zellen wurden nach 13 stündiger Vorinkubation mit Con A und 2-Mercaptoäthanol versetzt (s. Methode 4a $\beta$ ). Ein Teil der Kulturen erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen jeweils eines Ansatzes mit und ohne Ovalicin geerntet, der 100 000 x g Überstand gewonnen (s. Methode 17a) und die Ornithin-Decarboxylaseaktivität durch Freisetzung von  $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$  aus DL- $[1-^{14}\text{C}]\text{Ornithin}$  innerhalb von 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  bestimmt (s. Methode 17b).

- 100 000 x g Überstand aus Zellen - Ovalicin
- 100 000 x g Überstand aus Zellen + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

darauf steigt sie jedoch rasch an, um 12 Stunden nach Con A-Zusatz ein Plateau zu erreichen (Fig. 37). Ähnliche Befunde publizierten Kay und Lindsay (1973) von Phytohämagglutinin-stimulierten menschlichen Blutlymphozyten.

In Gegenwart von  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin findet man ebenfalls nach 4 - 5 Stunden einen Anstieg der Ornithin-Decarboxylaseaktivität, allerdings in leicht verringertem Ausmaß (Fig. 37). Ovalicin kann demnach die Expression eines der Schlüsselenzyme der Polyaminsynthese nicht unterdrücken. Die beobachtete geringe Reduktion ist vergleichbar mit der im gleichen Zeitraum meßbaren Proteinsynthesehemmung (vgl. Kap. C3). Da Ornithin-Decarboxylase eine außerordentlich kurze Halbwertszeit von 15 Minuten besitzt (Kay und Lindsay, 1973), spiegelt die Expressionshemmung durch Ovalicin vermutlich die erniedrigte Proteinsyntheseaktivität wider. Die geringe Reduktion der Ornithin-Decarboxylaseaktivität von durchschnittlich 30 % ist auch in Hinblick auf die langsame Ausprägung der Hemmung von Zellproliferation bei totaler Ausschaltung des Enzyms durch  $\alpha$ -Methylornithin (Mamont et al., 1976; Hank et al., 1974) nicht ausreichend, um eine Wirkung von Ovalicin über die Polyaminsynthese wahrscheinlich zu machen.

## 6. RNA-Synthese

E. Weiner fand, daß Ovalicin den Uridineinbau in säureunlösliches Zellysat stimulierter Mäusemilzzellen 20 Stunden nach Con A-Zusatz zu rund 20 % hemmt (Weiner, 1976; Hartmann et al., 1978). Es ist nun denkbar, daß Ovalicin nur die Synthese bestimmter RNA-Spezies selektiv unterdrückt. Macht die betroffene RNA-Spezies einen geringen Teil der während eines kurzen Zeitraums gebildeten Gesamt-RNA aus, so findet man - trotz völliger Hemmung einer RNA-Klasse - eine vergleichsweise geringe Reduktion der Total-RNA-Synthese. Es wurde deshalb der Einfluß von Ovalicin auf die RNA-Synthese genauer studiert.

### a) Kinetik der Hemmung

Zur Untersuchung des Ovalicineinflusses auf die Stimulation des Uridineinbaus nach Mitogenkontakt, wurden zu 2 Reihen parallel in kleinen Petrischalen angesetzten Milzzellkulturen zur Stunde 0 Con A und 2-Mercaptoäthanol in optimaler Dosis zugegeben. 2 weitere Reihen von Kulturen erhielten weder Mitogen, noch 2-Mercaptoäthanol. Zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn wurde den Kulturen [ $^3\text{H}$ ]Uridin angeboten und nach 1 Stunde der Einbau in RNA<sup>+</sup> der Lymphozyten (einschließlich der anhaftenden Zellen; vgl. Legende von Fig. 38) bestimmt. Bereits 2 Stunden nach Lektinzusatz findet man bei stimulierten Zellen einen fast doppelt so großen Uridineinbau wie in unstimulierten Zellen (Fig. 38). Dieser rasche Anstieg des Uridineinbaus wird auch von anderen Autoren beschrieben. Schon rund 30 bis 60 Minuten nach Phytohämagglutininzugabe zu Rinderlymphknotenzellen bzw. menschlichen Blutlymphozyten oder nach Con A-Zusatz zu Mäusemilzzellen ist ein signifikant erhöhter Einbau von Uridin beobachtbar (Peters und Hausen, 1971; Ling und Kay, 1975; Weiner, 1976). Mit fortschreitender Inkubationsdauer nimmt der Uridineinbau in säureunlösliches Ma-

---

<sup>+</sup>) Das säureunlösliche, [ $^3\text{H}$ ]Uridin inkorporierende Material aus gehemmten und ungehemmten Zellen ist zu über 98 % alkalilabil (Tab.2). Daraus folgern wir, daß es sich bei den Polymeren um RNA handelt.

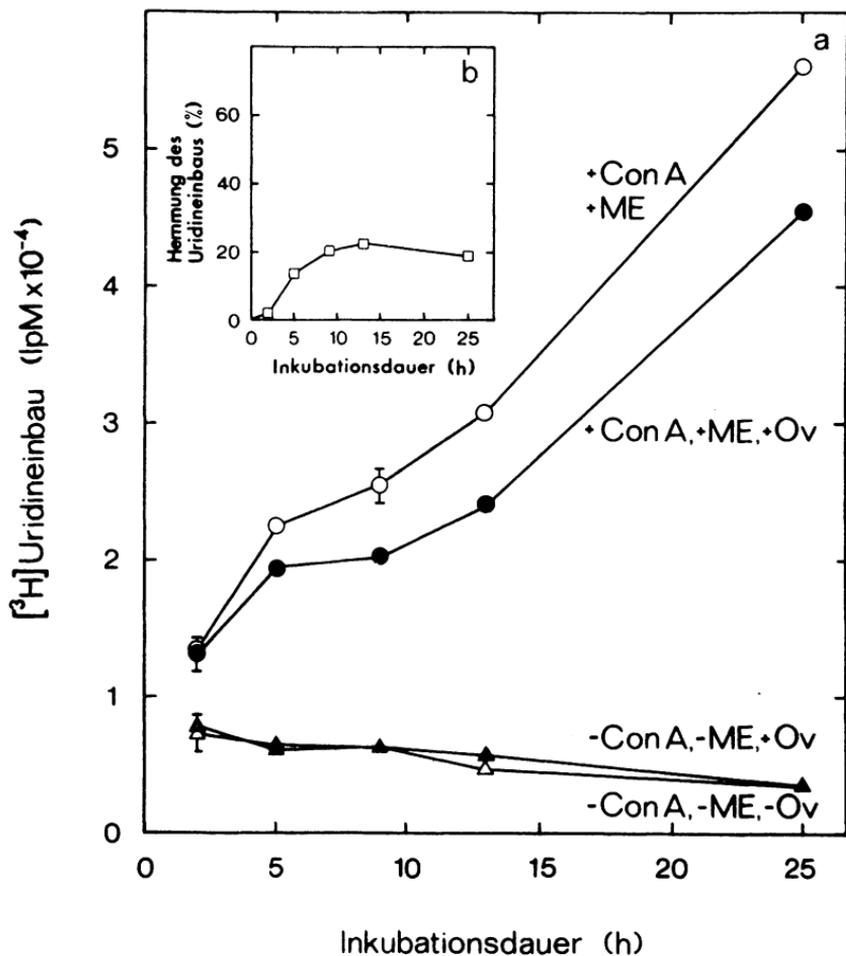


Fig. 38 Wirkung von Ovalicin auf den zeitlichen Verlauf des Uridineinbaus stimulierter und unstimulierter Lymphozyten

Jeweils  $6 \times 10^6$  Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden in kleinen Petrischalen nach 11 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ) und erhielten gegebenenfalls mit dem Mitogen Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M). Parallelkulturen wurden ohne Con A und 2-Mercap-

toäthanol inkubiert. 1 h vor den angegebenen Zeiten wurde zu den Ansätzen 3  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]Uridin (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; 2 Ci/mMol) pipettiert und nach 1 h das säureunlösliche Zellysat gewonnen (s. Methode 8a $\beta$ ). Zusätzlich wurden die anhaftenden Zellen isoliert. Dazu wurden 2 ml physiologische Kochsalzlösung nach dem Abpipettieren der Zellsuspension zugesetzt, der Zellrasen mit einem Stück Silikongummi abgekratzt und ebenfalls auf das Filter gebracht. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Methoden 8a $\beta$  und 10a beschrieben.

- a) Kinetik des Uridineinbaus stimulierter und unstimulierter Lymphozyten mit und ohne Ovalicin
  - b) Kinetik der Hemmung des Uridineinbaus stimulierter Lymphozyten
- + 2-Mercaptoäthanol, + Con A
  - + 2-Mercaptoäthanol, + Con A, + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)
  - △ - 2-Mercaptoäthanol, - Con A
  - ▲ - 2-Mercaptoäthanol, - Con A, + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

terial rasch zu (Fig. 38a). In unstimulierten Kontrollkulturen fällt die Einbaurrate dagegen langsam ab (Fig. 38a). Hieraus errechnet sich eine rund 15 fache Steigerung der Uridineinbaurrate durch Con A nach 25 Stunden. In Gegenwart von Ovalicin erhöht sich die Uridinkorporation stimulierter Zellen ebenfalls sehr rasch, bleibt jedoch bereits nach 5 Stunden deutlich hinter der Kontrolle ohne Toxin zurück. Die daraus resultierende Hemmung erreicht nach 12 Stunden ein Maximum von ungefähr 20 % und fällt bis zur 25. Stunde wieder leicht ab<sup>+) (Fig. 38b). Unstimulierte Zellen scheinen dagegen - im Rahmen der Meßgenauigkeit - durch Ovalicin nicht beeinflusst zu werden (Fig. 38a).</sup>

---

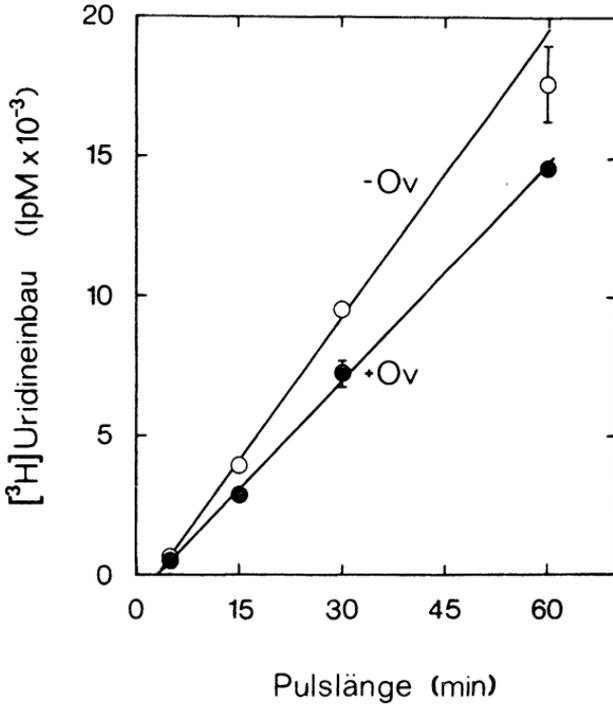
<sup>+) Die Hemmungsabnahme ist wahrscheinlich nicht real, da der Uridineinbau in säurefällbares Zellysat stimulierter Zellen unter den verwandten Pulsbedingungen (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; 2 Ci/mMol) im Gegensatz zu gehemmten Zellen nicht über eine Stunde linear ist (vgl. Fig. 39). Möglicherweise wird bei längeren Pulsen durch Verbrauch des Substrats die exogene Uridinkonzentration erniedrigt. Dies hat eine erniedrigte Aufnahmegeschwindigkeit zur Folge (vgl. Fig. 40a und Abschnitt b).</sup>

Was bedeutet nun der [ $^3\text{H}$ ] Uridineinbau in RNA? Um als direktes Maß für die RNA-Syntheseaktivität zu gelten, müßten folgende Voraussetzungen gegeben sein:

Die Sättigung des Ribonukleosidtriphosphatpools muß rasch erfolgen und Sättigungsgeschwindigkeit und Poolgröße unabhängig von der Mitogenstimulation der Lymphozyten bleiben, da der [ $^3\text{H}$ ]Uridineinbau das Produkt aus der Zahl der pro Zeiteinheit in RNA eingebauten UTP-Moleküle und aus der mittleren spezifischen Radioaktivität des UTP-Pools während des gleichen Zeitraums darstellt (Cooper, 1972).

Diese Voraussetzungen treffen für die RNA-Synthese (Cooper, 1972) in Lymphozyten im Gegensatz zur Proteinsynthese (vgl.

Abschnitt C3c) nicht zu. Nach dem spezifischen Transport von Uridin durch die Lymphozytenmembran muß das Nukleosid sequenziell durch die Enzyme Uridinkinase, UMP-Kinase und UDP-Kinase phosphoryliert werden, um letztlich UTP zu bilden. Dies dient dann als Substrat für RNA-Polymerasen. Nach Peters und Hausen (1971) scheint der geschwindigkeitsbestimmende Vorgang dieser Reaktionsfolge die Uridinaufnahme in die Zellen zu sein. So werden zur Sättigung des UTP-Pools Phytohämagglutinin-stimulierter menschlicher Blutlymphozyten 20 Stunden nach Mitogenzugabe rund 4 Stunden benötigt (Cooper, 1972). Die Uridinaufnahmegeschwindigkeit erhöht sich stark mit fortschreitender Inkubation nach Mitogenzugabe (Peters und Hausen, 1971; Weiner, 1976). Die reale Zunahme der RNA-Syntheserate nach Phytohämagglutinin-Stimulation ist nach Kalkulationen von Cooper (1972) eher 2 fach im Gegensatz zur beobachteten 10 - 50 fachen Steigerung des Uridineinbaus zur 20. Stunde nach Stimulation. Die rasche Zunahme des [ $^3\text{H}$ ]Uridineinbaus kurz nach Mitogenzugabe ist daher wahrscheinlich auf eine Erhöhung der spezifischen Radioaktivität des UTP-Pools zurückzuführen. Die Hemmung des Uridineinbaus durch Ovalicin kann somit prinzipiell an mehreren Stellen erfolgen: Transport, Phosphorylierung oder Einbau des radioaktiven RNA-Vorläufers können beeinflusst oder der Abbau der gebildeten RNA erhöht werden. Das oben beschriebene Experiment läßt keine Entscheidung für eine



**Fig. 39 Kinetik des Uridineinbaus ungehemmter und Ovalicin gehemmer Lymphozyten 24 Stunden nach Con A-Zugabe**

Nach 14 stündiger Vorinkubation wurden jeweils  $100 \times 10^6$  Zellen durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoäthanol stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Eine Kulturflasche erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen in 50  $\mu$ l BSS-Puffer (s. Material 3a) 2.5  $\mu$ g Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M). 24 h nach Mitogenzusatz wurden 0.9 ml Proben der Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a) und 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]Uridin (2 Ci/mMol) zupipettiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde der Uridineinbau durch rasches Abkühlen in einer Methanol/Trockeneis-Mischung (10 Sekunden) gestoppt und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

- Zellen - Ovalicin
- Zellen + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$ )

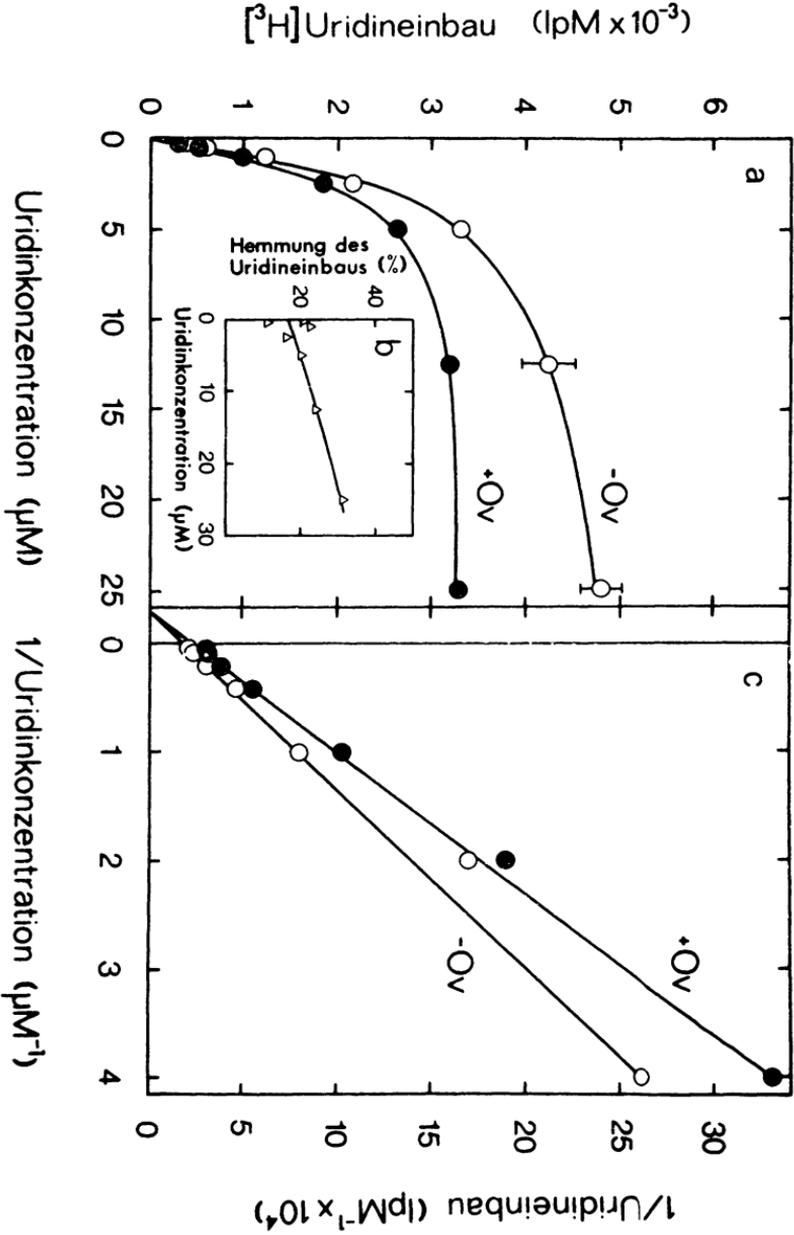
der Möglichkeit zu.

Interessant ist in diesem Zusammenhang noch ein anderer Versuch: Mißt man die Uridineinbauten gehemmter und ungehemmter Lymphozyten 24 Stunden nach Con A-Zusatz in verschiedenen langen Pulsen, so findet man bei beiden Kulturen für mindestens 30 Minuten eine lineare Zunahme des Einbaus. Bei den Ovalicin behandelten Zellen ist der Anstieg wie erwartet allerdings um ca. 20 % reduziert (Fig. 39). Die Geraden laufen nicht durch den Ursprung, sodaß sich eine bei beiden Proben gleichgroße Verzögerung des Uridineinbaus um wenige Minuten ergibt (Fig. 39). Was auch immer diese Verzögerungsphase verursacht (z. B. Sättigung des Uridintransportsystems, Phosphorylierung von Uridin usw.), sie wird durch Ovalicin nicht beeinflusst, sodaß eine verminderte Synthese der RNA (bzw. ein erhöhter Abbau der RNA) als Ort der Ovalicinwirkung wahrscheinlich wird.

#### b) Uridinkonzentrationsabhängigkeit der Hemmung

Um die Frage nach der Bedeutung der Hemmung des Uridineinbaus weiter zu erhellen, wurde seine Abhängigkeit von der Uridinkonzentration bei gehemmten und ungehemmten Zellen bestimmt. Zum einen ist es denkbar, daß gehemmte und ungehemmte Lymphozyten einen unterschiedlichen Uridinverbrauch aufweisen, sodaß nur unter Sättigungsbedingungen die Hemmung quantitativ gemessen werden kann (vgl. Kap. A3a). Weiter kann die Uridinaffinität des RNA-Synthesystems durch Ovalicin beeinflusst sein. Dies würde in einem geänderten 'scheinbaren'  $K_m$ -Wert sichtbar werden.

12 Stunden nach Con A-Stimulation wurden aus einer gehemmten Lymphozytenkultur, die mit dem Mitogen  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin erhalten hatte, und aus einer Kontrollkultur ohne Hemmstoff Aliquots entnommen und der [ $^3$ H]Uridineinbau in säureunlösliches Zellysat bei steigender Uridinkonzentration (zwischen 0.25 - 25  $\mu$ M) während eines 1 Stunden Pulses bestimmt. Mit steigenden Uridinkonzentrationen nimmt der Uridineinbau bei gehemmten und ungehemmten Zellen anfänglich linear zu, um dann bei vergleichbaren Konzentrationen in ein unterschiedlich ho-



hes Plateau überzugehen (Fig. 40a). Die aus den Meßwerten berechnete Hemmung des Uridineinbaus in säurefällbares Material ist in weiten Bereichen - abgesehen von gewissen Schwankungen - unabhängig von der Uridinkonzentration. Nur bei sehr hohen Uridinkonzentrationen im Medium scheint die Hemmung leicht erhöht zu sein (Fig. 40b). Die normalerweise angewandten Pulsbedingungen (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 0.2 bzw. 2 Ci/mMol entspricht 5 bzw. 0.5  $\mu\text{M}$  Uridin) liefern also Hemmwerte, die nicht stark von der maximal erreichbaren Reduktion des Uridineinbaus in Gegenwart von  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin abweichen. Trägt man die erhaltenen Meßwerte nach Lineweaver-Burk doppelt reziprok auf, so liegen die Werte auf Geraden, die sich auf der Abszisse schneiden (Fig. 40c). Daraus resultieren für Zellen mit und ohne Hemmstoff sehr ähnliche scheinbare ' $K_m$ -Werte', die sich nach Berechnung der Ausgleichsgeraden nach der Methode der kleinsten Quadrate zu 2.96  $\mu\text{M}$  bzw. 2.94  $\mu\text{M}$  für gehemmte Zellen ergaben. Peters und Hausen (1971) fanden bei Messung der Uridinaufnahme in Phytohämagglutinin-stimulierte Rinderlymphknotenzellen 6 Stunden nach Lektinzugabe einen etwas höheren Wert für Halb-

Fig. 40 Einfluß der Uridinkonzentration auf die Hemmung des Uridineinbaus Con A-stimulierter Milzzellen durch Ovalicin

$33 \times 10^6$  Zellen erhielten nach 13 stündiger Vorinkubation Con A (Endkonzentration: 1  $\mu\text{g/ml}$ ), 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M) und gegebenenfalls Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M (s. Methode 4a $\beta$ ). 12 h nach Mitogenzugabe wurden die Zellsuspensionen auf kleine Röhrchen verteilt und die Proben mit verschiedenen Mengen [ $^3\text{H}$ ]Uridin (0.2 Ci/mMol) versetzt (s. Methode 7c), sodaß die in (a) angegebenen Uridinkonzentrationen resultierten. 1 h später wurde der Einbau gestoppt und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode 8a $\beta$ , 10a).

- a) Uridineinbau in Abhängigkeit von der Uridinkonzentration
- b) Abhängigkeit der Hemmung des Uridineinbaus von der Uridinkonzentration
- c) Doppelt reziproke Auftragung der Meßwerte (a) nach Lineweaver-Burk

○ - Ovalicin  
● + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

sättigung des Uridinaufnahmesystems von  $5.3 \mu\text{M}$ . Da die Uridinkonzentrationsabhängigkeit für die Aufnahme des Nukleosids in Lymphozyten und für seinen Einbau in RNA gleich ist (Hausen und Stein, 1968), liegt es nahe, daß die oben aufgeführten ' $K_m$ -Werte' hauptsächlich das Uridintransportsystem charakterisieren. Aus der Gleichheit der ' $K_m$ -Werte' für gehemmte und ungehemmte Zellen kann man somit zu dem Schluß kommen, daß Ovalicin die Uridinaufnahme in ganze Zellen nicht beeinflusst. Dies steht auch im Einklang mit Befunden mit E.Weiner (1976), die besagen, daß Ovalicin die in 1 stündigen Pulsen gemessene [ $^3\text{H}$ ]Uridinaufnahme in den säurelöslichen Anteil Con A-stimulierter Milzzellen aus Mäusen selbst nach 20 stündiger Einwirkung nicht beeinträchtigt.

c) Größe der Hemmung

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Uridineinbau selbst unter optimalen Bedingungen, verglichen mit dem Thymidineinbau, nur gering durch Ovalicin gehemmt. Um direkt mit der DNA-Synthese vergleichen zu können, wurde neben dem Uridineinbau gleichzeitig der Thymidineinbau in säureunlösliches Zellysat von Zellen derselben Ansätze mit und ohne Ovalicin ( $2 \times 10^{-7} \text{M}$ ) bestimmt. Die in 1 stündigen Pulsen, 36 Stunden nach Con A bzw. Toxinzugabe gemessene Hemmung des Uridineinbaus beträgt zwischen 55 und 65 % der Reduktion der DNA-Synthese (ohne Beleg).

d) Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin auf den Uridineinbau

Wie rasch wird nun diese Hemmung des Uridineinbaus in säureunlösliches Zellysat erreicht? Der Versuch wurde analog zu den entsprechenden Experimenten zur Bestimmung der Wirksamkeit von Ovalicin auf DNA- und Proteinsynthese durchgeführt (s. Fig. 18, 29). Zu parallel angesetzten, Con A-stimulierten Milzzellkulturen wurde zu verschiedenen Zeiten nach Mitogenzusatz  $2 \times 10^{-7} \text{M}$  Ovalicin zugegeben. Kontrollzellen erhielten das gleiche Volumen BSS-Puffer (s. Material 3a). 12 Stunden nach Lektinzugabe wurde der [ $^3\text{H}$ ]Uridineinbau innerhalb zweier Stunden gemessen. Schon nach 3 stündiger Toxineinwirkung ist ei-

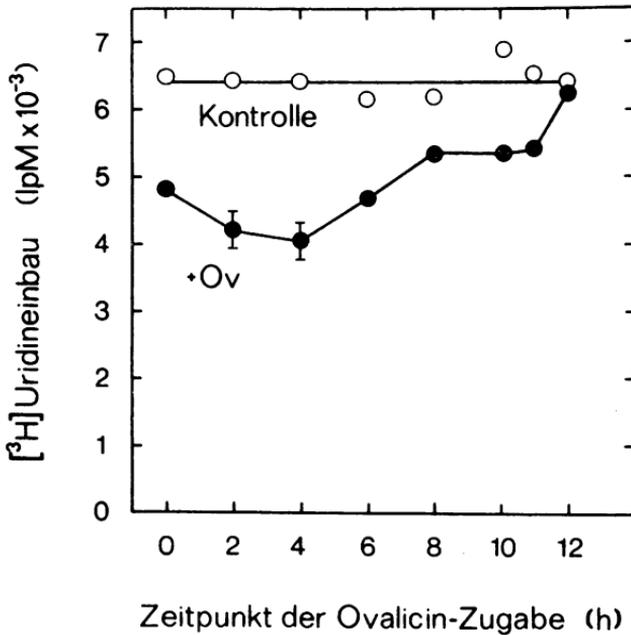


Fig. 41 Geschwindigkeit der Wirkung von Ovalicin auf den Uridineinbau stimulierter Lymphozyten zwischen der 12. und 14. Stunde nach Con A-Zugabe

Jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen ( $2 \times 10^6$ /ml) wurden nach 13 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoäthanol stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Zu den angegebenen Zeiten wurde den Kulturen in 25  $\mu$ l BSS (s. Material 3a) Ovalicin (Endkonzentration:  $2 \times 10^{-7}$  M) zugesetzt. Die Kontrollkulturen erhielten unter identischer Behandlung das gleiche Volumen BSS-Puffer. 12 h nach Mitogenzugabe wurden Proben in kleine Kulturröhrchen pipettiert (s. Methode 7a), 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]Uridin (0,2 Ci/mMol) zugesetzt (s. Methode 7b) und nach 2 h die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

- - Ovalicin
- + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)

ine signifikante Hemmung von rund 15 % feststellbar (Fig. 41). Um allerdings den maximalen Effekt zu erzielen (25 - 35 % Hemmung), muß Ovalicin 8 - 10 Stunden einwirken (Fig. 41).

e) Selektive Hemmung einzelner RNA-Spezies

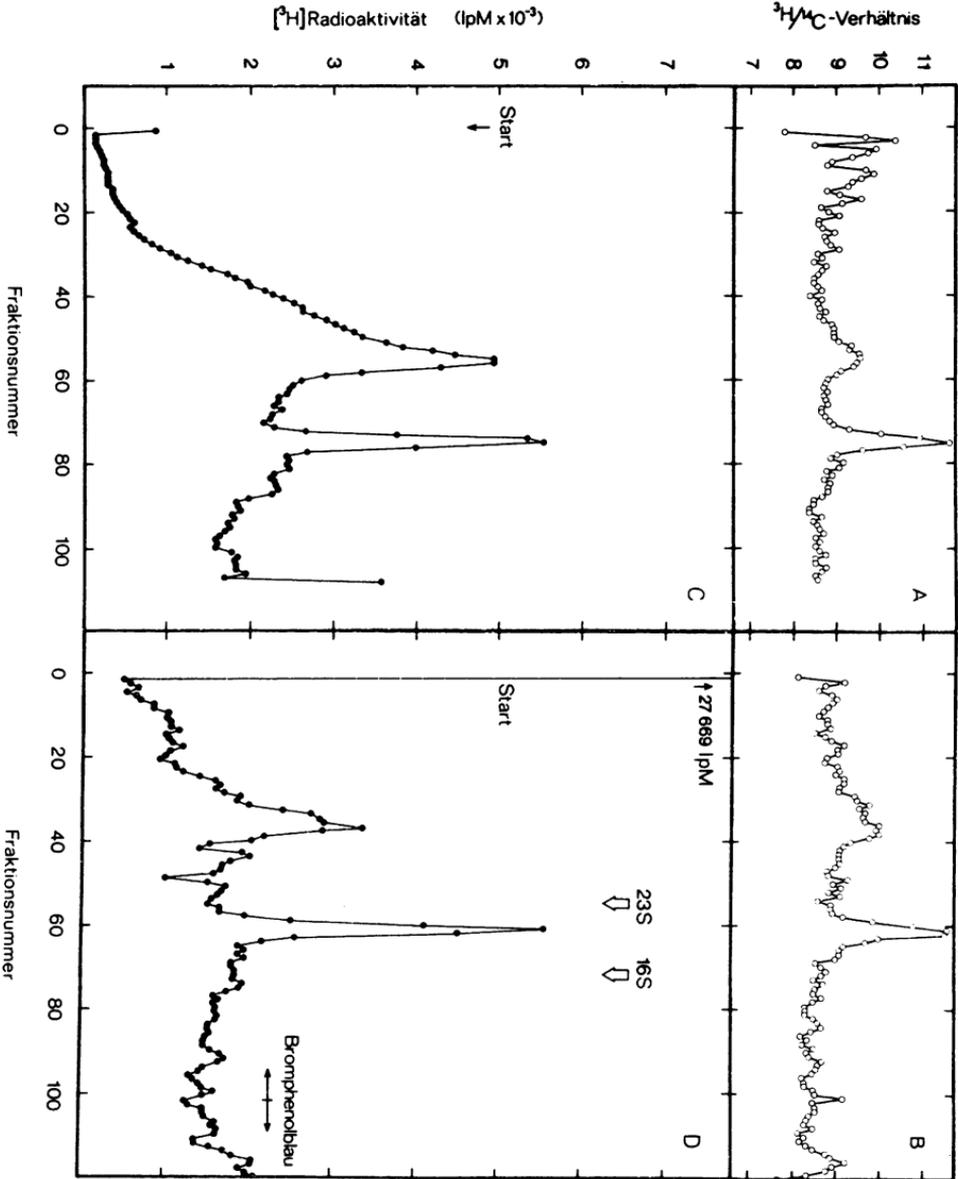
Wie auch in anderen eukariotischen Zellen gibt es in Lymphozyten verschiedene Klassen von Ribonukleinsäuren. Den größten Anteil an der Gesamtmenge bildet die ribosomale RNA (ca. 80 %) mit ihren Subklassen 28 S, 18 S und 5 S (Cooper, 1972). Diese für den Aufbau der Ribosomen wichtigen RNA-Moleküle, haben intrazellulär eine sehr lange Lebensdauer. 18 und 28 S RNA werden mit geringer Geschwindigkeit als 45 S-Vorläufermolekül im Nukleolus synthetisiert und erscheinen nach Methylierung und Zurechtschneiden im Zytoplasma. Ebenfalls ziemlich beständig ist die Transfer-RNA (tRNA), mit einem Anteil von rund 10 % an der Gesamt-RNA (Cooper, 1972). Ihr Vorläufer wird wie die 5 S rRNA im Nukleoplasma (Cooper, 1972) wahrscheinlich von Polymerase C synthetisiert (Chambon, 1975). Ihre Modifizierung (Methylierung, 'Processing') erfolgt jedoch erst im Zytoplasma (Kay und Cooper, 1969). Im Gegensatz dazu steht die heterodisperse, nukleare RNA (hnRNA), die im Nukleoplasma des Kerns als Hauptkomponente (>90 %) der rasch synthetisierten RNA gebildet wird. Diese Spezies stellt wahrscheinlich die Vorläufermoleküle für Messenger-RNA (mRNA) dar und ist extrem instabil, sodaß ihr Pool sehr klein ist (ca. 1 %).

Nach Mitogenstimulation der Lymphozyten werden die einzelnen RNA-Klassen akkumuliert, einmal durch Erhöhung der Neusynthese, zum anderen durch Verminderung des Abbaus (Cooper, 1972). Die Syntheserate der rRNA (Cooper, 1969; Cooper, 1972) und der tRNA (Kay und Cooper, 1969) steigt dabei im Vergleich zur heterogenen RNA überproportional an, was eine Erhöhung des Anteils der rRNA an der während eines kurzen Zeitintervalls synthetisierten Gesamt-RNA von kleiner 5 % in ruhenden Zellen auf 15 - 20 % in Phytohämagglutinin-aktivierten menschlichen Blut-Lymphozyten 20 Stunden nach Lektinzusatz zur Folge hat (Cooper, 1972). Entsprechend sinkt der Anteil der hnRNA an der rasch synthetisierten RNA auf ungefähr 80 %. Daraus wird sichtbar, daß der Metabolismus der einzelnen RNA-Klassen unabhängig voneinander reguliert wird. Ermöglicht wird dies wahrscheinlich dadurch, daß die einzelnen RNA-Spezies von verschiedenen RNA-

Polymerasen in voneinander separierten Kompartimenten synthetisiert werden (Kay und Ling, 1975; Lindell et al., 1978). Hieraus ergeben sich spezifische Eingriffsmöglichkeiten für Ovalicin zur selektiven Hemmung einzelner RNA-Spezies.

$\alpha$ . Produktanalyse in Gegenwart von Ovalicin synthetisierter RNA

Um diese Möglichkeit der Ovalicinwirkung zu untersuchen, wurden zwei identische Milzzellkulturen angesetzt und mit Con A stimuliert. Eine der beiden Kulturen erhielt zusätzlich mit dem Mitogen  $2 \times 10^{-7}$  M Ovalicin. 12 Stunden nach Versuchsbeginn wurde zur Markierung der Ribonukleinsäuren beiden Kulturen radioaktives Uridin in gleicher Konzentration zugesetzt. Die Zellen mit Toxin erhielten [ $^{14}\text{C}$ ], die Kontrollzellen [ $^3\text{H}$ ] markiertes Uridin. Nach 1 Stunde wurden die Zellsuspensionen vereinigt, von überschüssiger Radioaktivität freigewaschen und die RNA extrahiert. Die doppelt markierte RNA wurde anschließend in Polyacrylamidgelen in Gegenwart von Dodecylsulfat nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt, die Gele in Scheibchen zerschnitten und die [ $^{14}\text{C}$ ] und [ $^3\text{H}$ ] Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer bestimmt. Trägt man nach Korrektur der Impulse (s. Methode 10b) die Radioaktivität gegen die Fraktionsnummer auf, so findet man die Radioaktivität in 2 Hauptgipfeln, die mit Hilfe von Molekulargewichtsstandards (vgl. Fig. 1) zu rund 18 und 28 S bestimmt wurden (Fig. 42c, d). Sie stellen also die Hauptkomponenten ribosomaler RNA dar. Diese sind von einem großen Anteil RNA überlagert, deren Molekulargewicht sich über einen großen Bereich erstreckt. Ein kleiner Anteil ist so hochmolekular, daß er nicht in das Gel eindringen konnte. Dieser Anteil wächst drastisch an (auf ungefähr 10 % der Gesamtradioaktivität), wenn man den Vernetzungsgrad der Polyacrylamidgele erhöht (Fig. 42d; vgl. auch Shaaya, 1976). rRNA-Vorläufermoleküle (z. B. 45 S rRNA) treten nicht als aufgelöste Gipfel in Erscheinung. Bildet man nun für jede Fraktion das Verhältnis beider Isotope ( $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ), so findet man bei beiden Gelen erhöhte Werte in den Fraktionen, die die ribosomale RNA (28 S, 18 S und 5 S



RNA)<sup>+</sup>) enthalten (Fig. 42c, d). Dies ist mit einer selektiven Hemmung der 3 ribosomalen RNA-Spezies kompatibel (Tab. 17a). Die starken Schwankungen des  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses in den Fraktionen niedriger Radioaktivität sind wahrscheinlich auf ungenaue Messung geringer Aktivitäten zurückzuführen (Fig. 42a). Im Gegensatz zu Fraktionen mit rRNA liegt das  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis des nicht in das Gel gewanderten Materials (hnRNA?) unter dem Durchschnitt. Daraus resultiert eine geringere Hemmung dieser RNA-Klasse im Vergleich zur rRNA (Tab. 17a). Auffallend ist das unterschiedliche Ausmaß der Hemmung der rRNA-Spezies.

---

+) Bei dem in Fig. 42c dargestellten Gel wurde die 5 und 4 S Region nicht vermessen; bei dem in Fig. 42d dargestellten Gel fehlt die 4 S Region.

Fig. 42 Einfluß von Ovalicin auf die Synthese einzelner RNA-Spezies Con A-stimulierter Lymphozyten

2 Ansätze mit je  $100 \times 10^6$  Zellen wurden nach 12 stündiger Vorinkubation durch Zugabe von Con A und 2-Mercaptoethanol stimuliert (s. Methode 4a $\beta$ ). Eine der beiden Kulturen erhielt gleichzeitig mit dem Mitogen Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M). 12 h nach Mitogenzugabe wurden den Zellen in Anlehnung an Fillinger und Morris (1973) in 1 ml Wasser 100  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]Uridin (- Ovalicin; resultierende Konzentration: 2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; 0.58 Ci/mMol; 3.45  $\mu\text{M}$  Uridin), den Zellen mit Ovalicin 10  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]Uridin (resultierende Konzentration: 0.2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; 0.058 Ci/mMol; 3.45  $\mu\text{M}$  Uridin) zugesetzt. Nach 1 h wurde der Einbau gestoppt, die Zellsuspensionen vereinigt und die RNA extrahiert (s. Methode 18). Zur Analyse wurden die RNAs in 2.2 % Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgelen aufgetrennt (s. Methode 9b), die Gele in 1 mm breite Scheibchen zerschnitten und die [ $^3\text{H}$ ] und [ $^{14}\text{C}$ ] Radioaktivität jeder Fraktion bestimmt (s. Methode 10b). Als externe Molekulargewichtsmarker dienten 16, 23 S rRNA aus E. coli.

a, b)  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der Radioaktivität in den Fraktionen Gelelektrophorese der RNA in Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgelen (Acrylamidkonzentration: 2.2 %)

c) Acrylamid : N,N'-Methylen-bis-acrylamid = 48 : 1

d) Acrylamid : N,N'-Methylen-bis-acrylamid = 20 : 1

Tab. 17 Hemmung der Synthese einzelner 'pulse' und 'pulse-chase' markierter RNA-Spezies Con A-stimulierter Lymphozyten durch Ovalicin

Die Werte zur Berechnung der Synthesehemmung einzelner RNA-Spezies wurden den Figuren 42 (a) und 43 (b) entnommen. Zur Bestimmung der Gesamthemmung der RNA-Synthese wurde aus den Kulturen mit und ohne Hemmstoff (Versuchsbedingungen s. Fig. 42) vor Zugabe der Pulsmedien jeweils 2 x 0.9 ml der Zellsuspension entnommen, 1 µCi [<sup>3</sup>H]Uridin (0.058 Ci/mMol) zugesetzt (s. Methode 7a) und nach 1 h die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8aβ, 10a).

[<sup>3</sup>H]Uridineinbau (IpM): - Ovalicin 5 750 ± 52 (= 1.000)  
 + Ovalicin 3 818 ± 70 (= 0.664)

RNA-Markierung	Molekulargewicht der RNA-Spezies (S)	<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C-Verhältnis	Hemmung (%) <sup>+</sup>
(a)	RNA am Start	8.1	29
Puls: 12 - 13 (h nach Con A-zugabe)	37	10.0	43
	21	11.6	51
	5.7	9.3	38
(b)	32	8.8	35
	19	10.3	44
	5.2	9.0	36
	4.2	6.7	14

<sup>+</sup>) Berechnung der Synthesehemmung einzelner RNA-Spezies aus dem <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis:

<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis bei homogener Mischung aller RNAs (vor Elektrophores gemessen): 8.67

<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis bei homogener Mischung aller RNAs ohne Hemmung (berechneter Wert):  $\frac{a}{b \times 0.664} = 8.67$

Fortsetzung folgende Seite

So wird die Synthese der 5 S RNA zu 38 % und die der 18 S RNA zu 51 % gehemmt. Die Synthesehemmung der 28 S RNA entspricht mit 43 % eher der Reduktion der 5 S RNA (Tab. 17a). Die Ursache dafür kann einmal in der unterschiedlichen Empfindlichkeit des Metabolismus der einzelnen Spezies gegenüber Ovalicin liegen, zum anderen besteht die Möglichkeit, daß wenig gehemmte RNA (z. B. hnRNA) die selektiv gehemmten Spezies unterschiedlich stark 'verunreinigt'. So ist der Anteil an heterodisperser RNA im 28 S Bereich bedeutend größer als im 18 S Bereich (Cooper, 1972). Um zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren zu können, führte ich ein zweites leicht modifiziertes Experiment durch. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Versuch wurde nach der 1 stündigen [<sup>3</sup>H] bzw. [<sup>14</sup>C]Uridinmarkierung ('pulse') die Radioaktivität durch Zugabe eines 300 fachen Überschußes an 'kaltem' Uridin innerhalb von 30 Minuten aus den kurzlebigen RNA-Spezies verdrängt ('chase'). Durch Zugabe von Actinomycin D sollte der Wiedereinbau der katabolisch freigesetzten radioaktiven Bausteine durch Hemmung der RNA-Polymerasen verhindert werden (vgl. Fillingame und Morris, 1973). In Versuch 43 ist das Ergebnis dieses Versuchs dargestellt: Am auffälligsten ist der bedeutend geringere Anteil an heterogener RNA, die wegen ihrer kurzen Halbwertszeit von nur 8 Minuten in stimulierten Lymphozyten (Cooper, 1972) bevorzugt abgebaut wird. Dadurch treten die Gipfel stabiler RNA

---

Daraus folgt:  $\frac{a}{b} = 5.75$

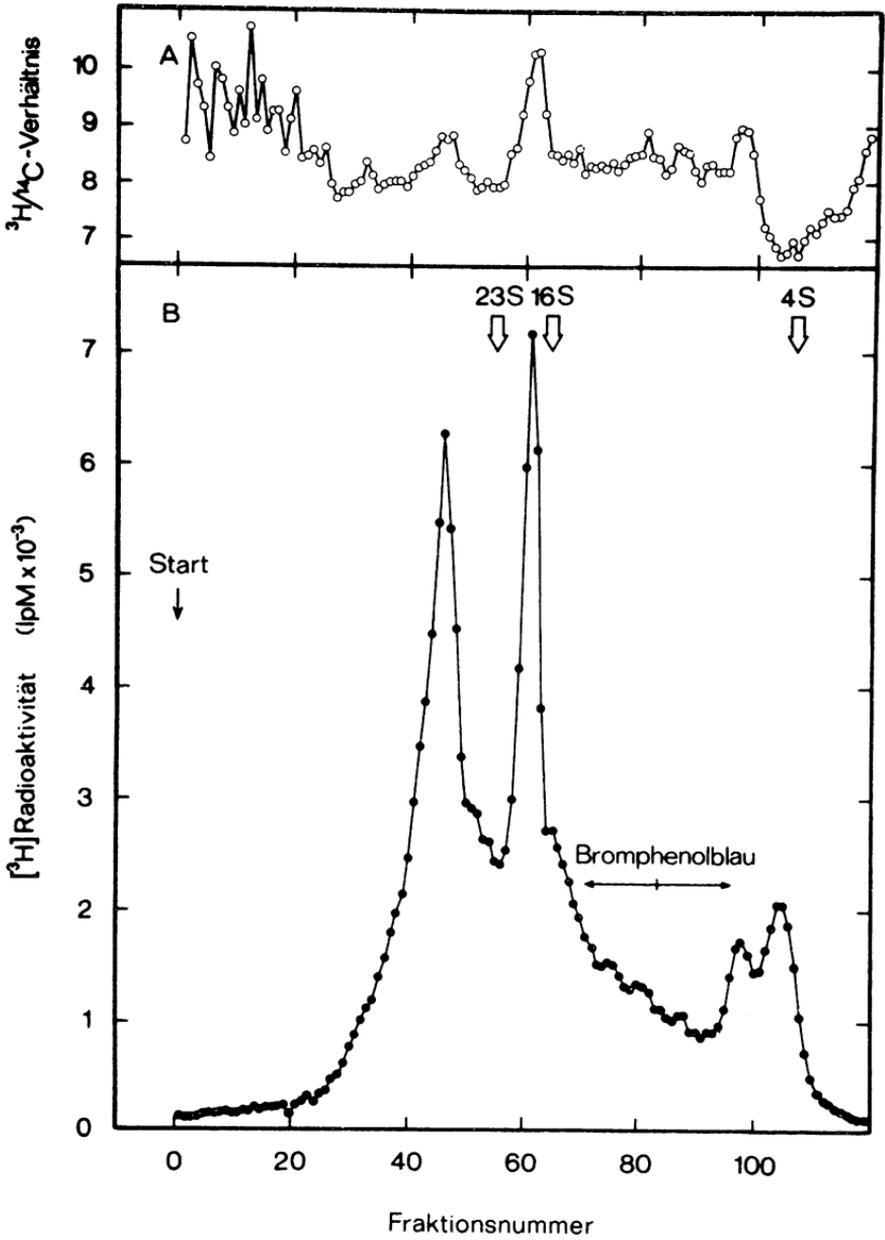
$a = [^3\text{H}] \text{IpM}$ ,  $b = [^{14}\text{C}] \text{IpM}$ ;

$\frac{a}{b} = ^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis (theoretisch), wenn der Ansatz mit [<sup>14</sup>C]Uridin ohne Ovalicin geblieben wäre

$a, b \times 0.664 =$  wirklich gemessene Radioaktivität (IpM)

Berechnungsbeispiel: Restaktivität  $X = \frac{a}{b} \times \frac{1}{(^3\text{H}/^{14}\text{C})_x}$

19 S RNA (b):  $X = \frac{5.75}{10.3} = 0.56$ ; dies entspricht einer Hemmung von 44 % (Tab. 17b).



deutlicher hervor. Wie auch im Pulsexperiment ist das  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis in den Fraktionen mit ribosomaler RNA signifikant erhöht. Die dadurch angezeigte selektive Hemmung liegt nur gering unter den Werten des Pulsversuchs, die relative Größe der Synthesehemmung der verschiedenen rRNA-Spezies bleiben trotz starker Reduktion kurzlebiger RNA-Spezies erhalten (Tab. 17b). Dies spricht gegen eine Beeinflussung des Zurechtschneidens der RNA-Vorläufermoleküle ('processing') durch Ovalicin und deutet auf ein unterschiedliches Eingreifen des Toxins in den Metabolismus einzelner RNA-Spezies hin. Dieses Phänomen kann jedoch auch eine rein meßtechnische Ursache haben. Emerson (1971) beobachtete in kontaktinhibierten Hühnerfibroblasten mit niedriger rRNA-Syntheseaktivität bei kurzen Pulsen mit radioaktiven RNA-Vorläufern eine im Vergleich zu rasch wachsenden Zellen zu geringe Markierung der 18 S RNA-Spezies. Bei längeren Pulsen näherte sich das Markierungsverhältnis (18 S/28 S) dem von rasch proliferierenden Zellen an. Beide rRNA-Spezies werden als ein Vorläufermolekül (45 S) von den rRNA-Genen abgelesen. Da die Sequenzen für 18 und 28 S rRNA unterschiedlich weit vom Startpunkt der Transkription entfernt sind und zu Beginn des Pulses viele 45 S Moleküle sich gerade in Synthese befinden, dürfte besonders bei kurzen Pulsen oder in langsam proliferierenden Zellen (z. B. in gehemmten Zellen) Radioaktivität bevor-

Fig. 43 Einfluß von Ovalicin auf die Synthese und 'processing' einzelner RNA-Spezies Con A-stimulierter Lymphozyten

Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie in Fig. 42 beschrieben; die Ansatzgröße betrug jedoch nur  $1/3$ . Zusätzlich wurde nach der Pulsmarkierung der Zellen mit  $[^3\text{H}]$  bzw.  $[^{14}\text{C}]$ Uridin ein 'chase' angeschlossen. Dazu wurde ein 300 facher Überschuß an unmarkiertem Uridin und Actinomycin D (Endkonzentration: 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt. Zur Gewinnung und Analyse der RNA s. Fig. 42. Als externe Molekulargewichtsmarker dienten 16 und 23 S rRNA aus *E. coli* und tRNA (4 S) aus Bierhefe.

- a)  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der Radioaktivität in den Fraktionen
- b) Gelelektrophorese der RNA in Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Rundgelen (Acrylamidkonzentration: 2.2 %; Acrylamid : N,N'-Methylen-bis-acrylamid = 48 : 1)

zugt in die rRNA-Spezies eingebaut werden, die distal vom Promotor liegt. Tatsächlich befindet sich die 28 S rRNA am 3'-Ende (d.h. Promotor distal) des 45 S Vorläufermoleküls, wie rDNA-Strukturuntersuchungen ergeben haben (Fedoroff, 1979). Cooper und Gibson (1971) interpretieren dagegen ähnliche Beobachtungen bei menschlichen Blutlymphozyten mit einem unterschiedlich raschen Abbau der in kurzen Pulsen markierten 28 S und 18 S rRNAs. Trotz prinzipiell gleicher Metabolisierungsrate von 18 und 28 S rRNA werden die neu synthetisierten, radioaktiv-markierten 28 S rRNA-Moleküle statistisch langsamer abgebaut, da sie im Gegensatz zur 18 S rRNA in einem meßbaren Pool eingeschleust und somit die markierten Moleküle durch eine große Anzahl unmarkierter Moleküle stark verdünnt werden. Besonders ausgeprägt zeigt sich dieser Unterschied bei ruhenden oder Cycloheximid gehemmten Lymphozyten, da ihre rRNA wahrscheinlich aus Mangel an rRNA schützenden Proteinen (ribosomale Proteine?) besonders rasch metabolisiert wird. Mit meinem Versuch kann zwischen beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden.

Zusätzlich taucht in diesem Gel in der 4 S Region ein Gipfel auf, der bei den anderen Gelen nicht gemessen wurde (Fig. 43). Dabei handelt es sich vermutlich um tRNA (Kay und Cooper, 1969), deren Synthese mit rund 14 % viel weniger als die der rRNA gehemmt wird (Fig. 43a, Tab. 17b).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der durch Ovalicin gehemmte Uridineinbau tatsächlich auf Hemmung der Synthese von RNA (bzw. Erhöhung von RNA-Abbau) zurückzuführen ist, da selektiv die Synthese einzelner RNA-Spezies inhibiert wird. hnRNA und tRNA-Synthese werden nur gering gehemmt. Dabei ist allerdings vorausgesetzt, daß die RNA-Polymerasen die RNA-Bausteine nicht aus verschiedenen, durch Kompartimentierung getrennten Pools entnehmen, deren Sättigung oder Größe durch Ovalicin unterschiedlichstark beeinflusst werden.

β. Einfluß von Ovalicin auf die RNA-Synthese ruhender Lymphozyten

Wie in der Einleitung zu diesem Abschnitt schon beschrieben wurde, spielt der rRNA-Metabolismus in ruhenden Lymphozyten eine untergeordnete Rolle (Cooper, 1972). Hauptsächlich wird hnRNA umgesetzt (Cooper, 1969; Cooper, 1972). Erst nach Mitogenstimulation wird vermehrt rRNA synthetisiert. Bei selektiver Hemmung der rRNA-Synthese sollte man erwarten, daß der gut meßbare Uridineinbau in unstimulierte Mäusemilzzellen nicht oder nur wenig durch Ovalicin gehemmt wird. Tatsächlich findet man bei ruhenden Lymphozyten nach 18 stündiger Vorinkubation (um den durch die Zellisolierung induzierten RNA-Metabolismus unstimulierter Lymphozyten abklingen zu lassen; vgl. Weiner, 1976) und anschließender 19 stündiger Einwirkung von Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M) nur eine Hemmung von 7 %, im Vergleich zur 30 % Reduktion des Uridineinbaus bei stimulierten Zellen nach gleichlanger Toxineinwirkung (Tab. 18; vgl. auch Fig. 38). Diese Beobachtung stehen im Einklang mit Befunden von Weiner (1976).

f) Wirkt Ovalicin auf die RNA-Synthese isolierter Kerne?

In Gegenwart von Ovalicin wird in Lymphozyten bevorzugt die Synthese ribosomaler RNA gehemmt, die durch RNA-Polymerase I (A) im Nukleolus katalysiert wird (Lindell et al., 1978). Wirkt nun Ovalicin direkt auf die Polymerisationsreaktion der Ribonukleosidtriphosphate zu RNA, so sollte der Einbau radioaktiver Vorläufer in säurefällbares Material isolierter Kerne durch Ovalicin gehemmt werden, vorausgesetzt die Aktivität von Polymerase I ist in einem solchen System meßbar.

Um dies zu überprüfen, wurden 36 Stunden nach Con A-Zugabe nach Land und Schäfer (1977) aus stimulierten und unstimulierten Mäusemilzzellen Kerne isoliert und ihre RNA-Syntheseaktivität anhand des Einbaus von [ $^3$ H]UTP in säurefällbares Material bei 25°C gemessen. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt der Einbau innerhalb von 20 - 30 Minuten linear an. Danach fällt die Einbaurrate, zumindest für Kerne aus stimulierten

Tab. 18 Einfluß von Ovalicin auf den Uridineinbau unstimulierter Lymphozyten

Nach einer Vorinkubation von 18 h (s. Methode 4a $\beta$ ) erhielt ein Teil der Kulturen mit jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. Nach 19 stündiger Einwirkung des Hemmstoffs wurde der [ $^3\text{H}$ ]Uridineinbau (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 2 Ci/mMol) in säureunlösliches Zelllysat währen 1 h bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a). Berechnung der Hemmung s. Methode 21.

Toxin	Kulturflasche	[ $^3\text{H}$ ]Uridineinbau (IpM)	Hemmung (%)
-	1	1 351 $\pm$ 0	7.5 $\pm$ 6.2
	2	1 221 $\pm$ 74	
Ovalicin $2 \times 10^{-7}$ M	3	1 157 $\pm$ 28	
	4	1 231 $\pm$ 8	

Zellen ab (Fig. 44). Unter den gleichen Bedingungen bauen Kerne aus unstimulierten Zellen weniger als 10 % des radioaktiven Vorläufers ein (Fig. 44). Dies entspricht angenähert den in ganzen Zellen gefundenen RNA-Syntheseaktivitäten (Tab. 19).

Zur Charakterisierung des zellfreien Systems wurde der Einfluß von  $\alpha$ -Amanitin und Actinomycin D untersucht. 200  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Amanitin, das in dieser Konzentration die Polymerasen II und III in isolierten Kernen hemmt (Benecke und Penman, 1977), reduzieren den UTP-Einbau um knapp 80 % (Fig. 45; vgl. Panijel et al., 1972). Nach diesem Befund sollte man die restlichen 20 % der Gesamteinbauaktivität der RNA-Polymerase I zuschreiben können. In Gegenwart von niedrigen Dosen Actinomycin D (40 ng/ml) wird - wie auch in der Literatur berichtet (Lindell, 1976) - der Einbau von UTP in säureunlösliche Polymere nur gering gehemmt

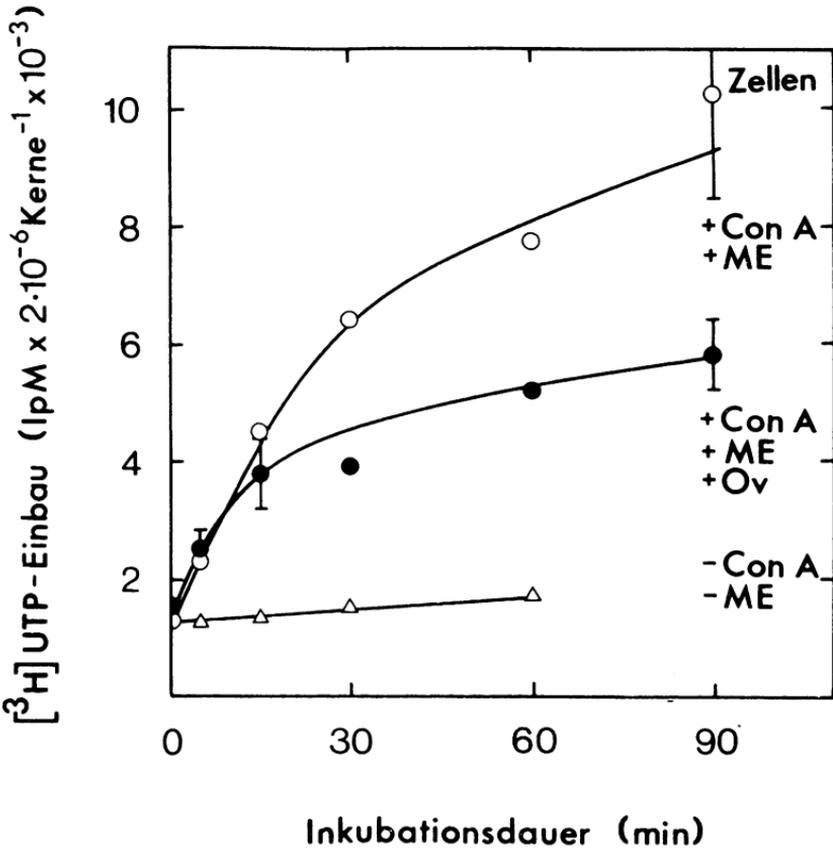


Fig. 44 Kinetik des  $[^3\text{H}]$ UTP-Einbaus in Kerne unstimulierter, stimulierter und Ovalicin behandelter, stimulierter Lymphozyten

6 Ansätze mit  $100 \times 10^6$  Zellen erhielten nach 12 stündiger Vorinkubation Con A und 2-Mercaptoäthanol, 2 zusätzlich Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M (s. Methode 4a $\beta$ ). 2 weitere, parallel angesetzte Kulturen blieben ohne Zusätze. 36 h nach Mitogenzusatz wurden die Zellen geerntet, die Kerne präpariert (s. Methode 13a $\alpha$ ), die isolierten Kerne zum Einbau von  $[^3\text{H}]$ UTP unterschiedlich lang bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert (s. Methode 19) und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methode 8d).

- Zellen + Con A, + 2-Mercaptoäthanol
- Zellen + Con A, + 2-Mercaptoäthanol, + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}\text{M}$ )
- △ Zellen - Con A, - 2-Mercaptoäthanol

Tab. 19 Einfluß von Ovalicin auf den Uridineinbau Con A-stimulierter Lymphozyten. - in vivo Kontrollen für Kern-test.

Die Zellen wurden wie in Fig. 45 beschrieben, stimuliert, 36 h nach Mitogenzusatz wurden je Flasche 0,9 ml der Zellsuspension entnommen (s. Methode 7a) und der [<sup>3</sup>H]Uridineinbau (1 µCi/ml; 0,2 Ci/mMol) während 1 h gemessen (s. Methoden 8aß, 10a).

Zusätze	Kulturflasche	[ <sup>3</sup> H]Uridineinbau (IpM)	
		Einzelwerte	Mittelwert (% der Kontrolle)
-	1	520 524	522 ± 2
Con A 2-Mercaptoäthanol	2 3 4 5	27 833 26 874 27 368 29 478	27 888 ± 1 130 (100)
Con A 2-Mercaptoäthanol Ovalicin	6 7	20 988 20 246	20 617 ± 371 (74)

(in diesem Experiment zu ca. 30 %; Fig. 45)<sup>+</sup>).

Diese Versuche zeigen, daß das zellfreie System in seinen Eigenschaften den in der Literatur beschriebenen Systemen ähnlich ist, Inhibitoren ungehindert Zutritt haben und auch kleinere Hemmungen nachweisbar sind. Setzt man nun den Kernen Ovalicin zu, so findet man selbst bei einer Konzentration von

<sup>+</sup>) Durch niedrige Dosen Actinomycin D wird selektiv die Transkription einer Klasse von mRNAs verhindert. Diese nicht abgelesenen Gene tragen möglicherweise die Information für ribosomale Proteine (Lindell et al., 1978).

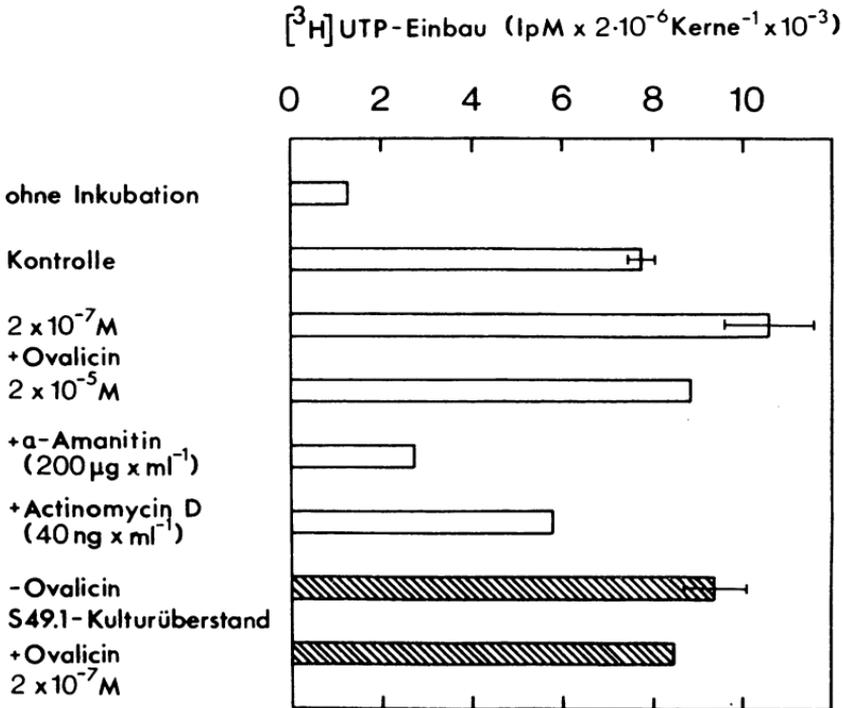


Fig. 45 Wirkung von Ovalicin auf den  $[^3\text{H}]$ UTP-Einbau in Kerne Con A stimulierter Milzzellen

Stimulation der Zellen, Kernisolierung und Messung des UTP-Einbaus in Kerne erfolgten wie in Fig. 44 beschrieben. Es wurden jedoch nur Kerne aus ungehemmten Zellen in Gegenwart der in der Figur angegebenen Zusätze getestet.

Inkubationsdauer: 1 h bei  $25^{\circ}\text{C}$ . Alle Werte wurden in Parallelansätzen doppelt bestimmt. (Ausnahme: + Ovalicin ( $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ))

$2 \times 10^{-5} \text{ M}$  keinen Einfluß auf den während 1 Stunde gemessenen UTP-Einbau (Fig. 45). Die bei  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$  Ovalicin beobachtete 'Aktivierung' ist wahrscheinlich nicht signifikant. Ovalicin aus S49.1-Lymphomzellüberstand ('metabolisiertes' Ovalicin) ist ebenfalls unwirksam (Fig. 45). Ovalicin hat demnach auf die, zumindest in diesem System aktivierten Polymerase keine Wir-

kung. Auf der anderen Seite zeigen Kerne aus Ovalicin behandelten Zellen eine deutlich verminderte RNA-Syntheseaktivität (Fig. 44). Die in ganzen Zellen gefundene Hemmung der RNA-Synthese bleibt also im zellfreien Kernsystem erhalten (Tab. 19; Fig. 44).

Die RNA-Synthesehemmung durch Ovalicin erfolgt also wahrscheinlich über einen Defekt im Synthese- oder Abbauapparat für RNA und nicht durch Mangel an radioaktiv markierten Vorläufermolekülen, da in diesem Fall bei freiem Zutritt des Substrats keine Hemmung im zellfreien System auftreten dürfte.

## Diskussion

### A. Zellselektive Wirkung von Ovalicin

Die im ersten Abschnitt dieser Arbeit beschriebenen Versuche bestätigen die hohe Wirksamkeit des Sesquiterpens Ovalicin gegenüber lymphoiden Zellen. Myelomazellen bilden dabei möglicherweise eine Ausnahme (Fig. 16, 17). Mäusemilzzellen (vgl. dazu Weiner, 1976; Hartmann et al., 1978) und T-Lymphomzellen werden vergleichsweise rasch bei außerordentlich niedrigen Konzentrationen von  $6 - 10 \times 10^{-10}$  M halbmaximal gehemmt (Tab. 20; Fig. 6). Diese exzeptionelle Wirksamkeit scheint auf lymphoide Zellen beschränkt zu sein. Die im Tierexperiment an Mäusen durch Vergleich des Ovalicineinfluß auf die Mitoserate Antigen-stimulierter Milzzellen und Darmepithelzellen gefundene selektive Unterdrückung von Immunocyten (Lazáry und Stähelin, 1968), konnte auch in Zellkultur beobachtet werden. Der Thymidineinbau der nicht lymphoiden Zelllinien 3T6 (Maus) und HeLa (Mensch) ist nämlich gegenüber Ovalicin weitaus resistenter und wird nur langsam beeinflußt (Tab. 20). Besonders augenfällig wird der Unterschied, wenn man den Abfall der DNA-Syntheseaktivität nach Einsetzen der Ovalicinwirkung vergleicht (Fig. 21; Tab. 22). Er erfolgt bei S49.1-Zellen etwa 10 mal rascher als bei 3T6-Zellen (Tab. 22). Allerdings werden diese nicht lymphoiden Zelllinien bei gleich niedrigen Toxinkonzentrationen gehemmt. Daraus kann man schließen, daß in den untersuchten Zellarten (Ausnahme: Myelomzellen?) der gleiche Rezeptor<sup>+</sup>) existiert, an den Ovalicin mit außergewöhnlich hoher Affinität bindet. Diese starke Wechselwirkung ist sonst nur noch von Hormon/Hormonrezeptor-Komplexen bekannt (s. z.B. Clark und Peck, 1978). Der Besitz des Rezeptors scheint jedoch für eine sich rasch ausprägende Hemmung der Zelle nicht auszureichen. Zusammenfassend ergibt sich folgende Reihenfolge der Wirkge-

---

<sup>+</sup>) Der Begriff 'Rezeptor' wird hier in seiner allgemeinsten Bedeutung gebraucht.

schwindigkeit von Ovalicin auf die Zellvermehrung (gemessen am Thymidineinbau):

Mäusemilzzellen > S49.1-Lymphomzellen > 3T6, HeLa-Zellen

Ist es nun möglich, daß Ovalicin nicht nur zwischen lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen unterscheidet, sondern auch Subpopulationen von Lymphozyten unterschiedlich stark hemmt? Diese aufgrund der nicht vollständig hemmbaren DNA-Synthese bereits von E. Weiner (1976) aufgeworfene Frage wurde von mir genauer untersucht. Zuerst wurde sichergestellt, daß die DNA-Restsynthese, die man der Replikation nicht gehemmter Subpopulationen zuschreiben könnte, kein Meßartefakt aufgrund unzureichender Pulsbedingungen darstellt (Fig. 10). Durch autoradiographische Untersuchungen konnte eine gleichförmige Hemmung der DNA-Synthese aller Lymphozyten ausgeschlossen werden. Einzelne Zellen oder Zellgruppen scheinen dem Einfluß von Ovalicin völlig oder zumindest weitgehend entkommen zu können.

Welche Subpopulation(en) kommen als Zielzellen in Betracht? Am einfachsten lassen sich Lymphozyten aufgrund funktioneller Kriterien in B- und T-Zellen unterteilen (vgl. dazu Kap. A3). Da in der Literatur bereits Hemmstoffe beschrieben sind, die selektiv die Proliferation von Zellen der T-Reihe unterdrücken, lag es nahe, eine ähnliche Arbeitshypothese für die differenzielle Wirksamkeit von Ovalicin aufzustellen. So wirkt beispielsweise Desoxyadenosin bevorzugt auf T-Lymphozyten bzw. auf T-Zelllinien (Carson et al., 1978). Wegen der in diesen Zellen besonders hohen Nukleosidkinaseaktivitäten, wird wahrscheinlich dATP - besonders bei gleichzeitiger Deaminasehemmung - zu toxischen Mengen angehäuft (Carson et al., 1977). Bereits seit langem ist die besondere Empfindlichkeit von Thymozyten gegenüber Hydrocortison bekannt (vgl. Kap. A3c). Erst in jüngster Zeit dagegen wurde von Cyclosporin A, einem immunsuppressiven Peptidmetaboliten aus Trichoderma polysporum berichtet, das bevorzugt T-Lymphozyten aus Mäusen hemmt (Borel und Wiesinger, 1976; Borel et al., 1977). Diese Befunde lassen darauf schließen, daß prinzipiell biochemische Unterschiede zwischen Lymphozytensubpopulationen existieren müssen. Tatsächlich ergaben die Untersuchungen an Lymphom- (T-

Tab. 20 Wirkungsgeschwindigkeit von Ovalicin auf die DNA-Synthese verschiedener Zelltypen

Zelltyp	Einwirkungsdauer für 50 % Hemmung des Thymidineinbaus durch Ovalicin (h)	Beleg	Zellzyklusdauer ohne Ovalicin (h)	Beleg
Mäusemilzzellen	12 - 24 <sup>1)</sup> ( 6 - 12) <sup>2)</sup>	Fig. 19 Fig. 18	12 - 13 <sup>3)</sup> 8 - 22 <sup>4)</sup> 18 <sup>5)</sup>	Gerhart et al., 1976 Lohrmann et al., 1974 Andersson et al., 1978
S49.1-Zellen	30 - 34	Fig. 21	16	Fig. 22, 26
HeLa	> 48	Fig. 7b	15	Fig. 7a
3 T6	> 60	Fig. 7b	12	Fig. 7a

1) Abhängig vom Meßzeitpunkt

2) Für halbmaximale Hemmung (Plateauwert = 100 %)

3) Con A stimulierte Thymozyten (Maus)

4) Phytohämagglutinin-oder allogene-stimulierte Blutlymphozyten (Mensch, Hund, Ratte)

5) Lipopolysaccharid-stimulierte Milzzellen (Maus)

Zelltyp) und Myelomzelllinien (B-Zelltyp) ausgeprägte Unterschiede in der Wirksamkeit von Ovalicin gegenüber Zellen von unterschiedlichem Subklassentypus. Die Zellvermehrung von S49.1-Lymphomzellen wird bedeutend effektiver gehemmt, als die von Cl.18- und RPC 5.4-Myelomzellen. Allerdings haben die getesteten Myelomlinien eine längere Zellzyklusdauer, was in die Berechnung der Hemmgeschwindigkeit miteingeht. Ein kurzer Zellzyklus ist jedoch keine ausreichende Voraussetzung für rasche Hemmbarkeit durch Ovalicin, da z.B. der Thymidineinbau in 3T6-Zellen trotz einer Verdopplungsdauer von nur 12 Stunden langsamer gehemmt wird als in S49.1-Zellen, die sich alle 16 Stunden teilen (Tab. 20).

Versuche von E. Weiner (1976) machen eine selektive Hemmung auf dem klassischen T/B-Zellniveau wenig wahrscheinlich. Sie beobachtete unabhängig vom Organursprung der Lymphozyten (Milz, Thymus, Lymphknoten, Hydrocortison-atrophierter Thymus) und Art des Mitogens (Con A, Lipopolysaccharid, 'Poke weed mitogen', Phytohämagglutinin) angenähert die gleiche DNA-Restsynthese, obwohl sich in jedem Fall die aktivierten Lymphozyten aus anderen Subklassen zusammensetzten (vgl. Andersson et al., 1972c; Janossy und Greaves, 1971, Stobo, 1972). Eine Ausnahme bilden Milzzellen aus 'nackten Mäusen' (nu/nu athymisch), die nach Lipopolysaccharid-Stimulation kaum durch Ovalicin beeinflusst werden. Milzzellen dieses Ursprungs enthalten einen großen Anteil Blastzellen (Weiner, 1976; Moerman, 1977), die in ihrer geringen Empfindlichkeit gegenüber Ovalicin wahrscheinlich den stärker differenzierten Zellen der 2. Generation entsprechen (vgl. Ovalicinpulsversuche Kap. B1).

Die Resistenz der hypothetischen Subpopulation ist nicht absolut. Nach längerer Einwirkung (nach 48 - 60 Stunden) von Ovalicin wird der nicht hemmbare Thymidineinbau immer kleiner (Fig. 36). Dies kann bedeuten, daß die resistenten Zellen nur sehr langsam gehemmt werden oder sie der Wirkung des Toxins während des 1. Zellzyklus entgehen können. Die letztgenannte Möglichkeit, die z.B. beim Auflaufen von S49.1-Lymphomzellen auf einen durch Dibutyryl-cAMP erzeugten G<sub>1</sub>-Block beobachtet wird (Coffino et al., 1975), könnte alle Zellpopulationen in gleichem Maße betreffen.

## B. Zellzyklus und Ovalicinwirkung

Um dieses Problem anzugehen, wurde mit Hilfe von S49.1-Zellen die Hemmcharakteristik von Ovalicin genauer untersucht. Auffallend ist das langsame Auftreten der Hemmung, unabhängig davon, ob man Zellzahl oder Thymidineinbau als Meßparameter für Zellproliferation wählt (Fig. 21, 22). Dies scheint für alle Zellarten zuzutreffen, denn bei keiner der untersuchten Zellarten ist ein Einfluß auf die Proliferation kurz nach Toxinzugabe feststellbar (Tab. 20, 21, 22). Wahrscheinlich ist weder eine Diffusionsbehinderung noch eine nötige Metabolisierung des Hemmstoffs zum aktiven Toxin Ursache für diese Hemmverzögerung (Fig. 23, 24). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß Ovalicin nach metabolischer Aktivierung praktisch irreversibel an Zellbestandteile bindet und so nicht als rascher wirksamer Toxinmetabolit nachzuweisen ist. Für die weiteren Überlegungen wurde jedoch aufgrund der experimentellen Hinweise ein rascher Zutritt des aktiven Hemmstoffs an den Wirkort vorausgesetzt.

Kann man nun aufgrund der Hemmkinetik den Zeitpunkt der Toxinwirkung während des Zellzyklus oder den Wirkort eingrenzen? Dazu muß man sich zuerst klarmachen, daß jeder Hemmstoff mit den oben genannten Voraussetzungen rasch wirkt, wenn man nur die entsprechende Zielreaktion mißt. Bestimmt man dagegen die Zellproliferation anhand des Thymidineinbaus oder der Zellzahl, so kann man prinzipiell zwischen zwei Gruppen von Hemmstoffen unterscheiden:

- i) Hemmstoffe, die sofort auf die oben genannten Meßparameter wirken
- ii) Hemmstoffe, die erst nach einer Verzögerungsphase einen oder beide Meßparameter beeinflussen

Abgesehen von Toxinen, die DNA-Synthese oder Mitose direkt verhindern, zählen Hemmstoffe zu dieser Gruppe, die eng mit den Meßparametern gekoppelte Reaktionen hemmen oder in essentielle Funktionen der Zelle eingreifen, die große Bereiche des Stoffwechsels lahmlegen. Als Beispiel seien Hemmstoffe der Proteinbiosynthese aufgeführt, die rasch eine Hemmung der DNA-Synthese nach sich ziehen (Übersicht s. Richter, 1977). In S49.1-Lymphomzellen be-

wirken Cycloheximid oder hohe Dosen Actinomycin D durch Ausschaltung von Protein- bzw. RNA-Synthese einen raschen Abfall der DNA-Synthese innerhalb zweier Stunden (Unveröffentlichte Versuche zitiert in Harris, 1970).

Aufgrund der charakteristischen Eigenschaft von Ovalicin erst nach einer langen Verzögerungsphase auf DNA-Synthese (ca. 22 Stunden) und Zellvermehrung (ca. 20 Stunden) zu wirken (Tab. 21, 22), muß man Ovalicin zur zweiten Gruppe der Hemmstoffe zählen.

Zur zweiten Gruppe gehören z.B. zellzyklusspezifisch wirkende Hemmstoffe, die Zellen an einer bestimmten Stelle des Zellzyklus anhalten. Dies hat zur Folge, daß diese Toxine erst nach einer charakteristischen Verzögerungsphase - abhängig vom zeitlichen Abstand des Blocks vom Beginn der Meßreaktion im Zellzyklus - ihre Wirkung entfalten. Ist der Block weitgehend vollständig, so sollten praktisch alle Zellen innerhalb der Dauer eines Zellzyklus arretiert und Proliferation der Zellen zum Stillstand gekommen sein.

Dibutyryl-cAMP z.B. hält S49.1-Lymphomzellen in der frühen G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus an (Coffino et al., 1975). Nach einer Verzögerungsdauer von 3 Stunden, die ungefähr der G<sub>1</sub>-Phasenlänge entspricht (laut Literatur 2 Stunden; Coffino et al., 1975), nimmt die Hemmung der DNA-Synthese exponentiell mit einer Verdopplungsdauer von rund 4.5 Stunden zu (Tab. 22, Fig. 21), sodaß nach Ablauf eines Zellzyklus (16 h) die DNA-Syntheserate nur noch wenige Prozent der Kontrolle beträgt (Fig. 21). Dabei können sich die Zellen noch einmal teilen (Coffino et al., 1975; Fig. 22). Zellvermehrung hört also auf, nachdem noch ein Zellzyklus von den Zellen durchlaufen ist (Tab. 21).

Die Hemmkinetik Ovalicins weicht von diesem Schema deutlich ab. Während nach einer ähnlich langen Verzögerung wie bei Dibutyryl-cAMP, Hemmung der Zellvermehrung einsetzt (ca. 20 Stunden; Tab. 21), wird die DNA-Synthese erst nach 22 Stunden gehemmt (Tab. 22). Ovalicin beginnt offensichtlich nach einer Latenzperiode von 20 - 22 Stunden DNA-Synthese und Zellteilung gleichzeitig zu beeinflussen. Im Unterschied zur Wirkung von Dibutyryl-cAMP nimmt die Hem-

Tab. 21 Verzögerungsphase und Inaktivierungsgeschwindigkeit der Zellvermehrung bei Einwirkung verschiedener Hemmstoffe auf S49.1-, 3T3-, SV3T3- und L-Zellen

Durch halblogarithmische Auftragung der Zellzahl von Kulturen mit Hemmstoff (Kontrollen entsprechen jeweils 100 %) gegen die Inkubationsdauer erhält man Geraden, die auf 100 % extrapoliert, die Verzögerungsphase ergeben und aus deren Anstieg man die Verdopplungsdauer der Hemmung ablesen kann.

Zelltyp	Hemmstoff	Hemmung der Zellproliferation		Zellzyklusdauer (h) ohne Hemmstoff	Beleg
		Dauer der Verzögerungsphase (h)	Verdopplungsdauer der Hemmung (h)		
S49.1	Ovalicin	20	26	16	Fig. 21, 26
S49.1	Dibutyryl-cAMP	23	20	20	Coffino et al. (1975) aus Fig. 1 entnommen
3T3	MGBG <sup>+</sup> )	14	21	15	Rupniak und Paul (1978a) aus Fig. 5 entnommen
SV3T3	MGBG <sup>+</sup> )	14.5	18	14.5	Rupniak und Paul (1978a) aus Fig. 5 entnommen
L-Zellen	Actinomycin D	12.5	16.5	18	Perry und Kelley (1968) aus Fig. 3 entnommen

+) Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon)

Es gibt 3 Fälle bei Zellvermehrungshemmung:

1. Die absolute Zellzahl nimmt trotz Hemmung zu (Verdopplungsdauer der Hemmung > Zellzyklusdauer)
2. Die Zellzahl bleibt nach der Verzögerungsphase konstant (Verdopplungsdauer der Hemmung = Zellzyklusdauer)
3. Die Zellzahl nimmt nach Verzögerungsphase ab (Verdopplungsdauer der Hemmung < Zellzyklusdauer)

Tab. 22 Verzögerungsphase und Inaktivierungsgeschwindigkeit bei Hemmung der DNA-Synthese von S49.1- und 3T6-Zellen durch Ovalicin und Dibutyryl-cAMP

Zum besseren Vergleich wurde der Logarithmus der Restaktivitäten - erhalten durch Bildung des Quotienten (gehemmte Probe<sub>t=x</sub>/ungehemmte Probe<sub>t=x</sub>) - gegen die Einwirkungsdauer des Hemmstoffs aufgetragen (Werte aus Fig. 21).

Die Werte wurden rechnerisch über die Methode der kleinsten Quadrate (Regressionsgerade) bestimmt.

Zelltyp	Hemmstoff	Hemmung des Thymidineinbaus	
		Dauer der Verzögerungsphase (h)	Verdopplungsdauer der Hemmung (h)
S49.1	Ovalicin	22	9 - 12
S49.1 (Dibutyryl-cAMP synchronisiert)	Ovalicin	10.5	14
S49.1	Dibutyryl-cAMP	3	4.4
3T6	Ovalicin	0.3	120

mung der DNA-Syntheseaktivität von S49.1-Zellen in Gegenwart von Ovalicin mit einer Verdopplungsdauer von 9 - 12 Stunden nur langsam zu (Tab. 22). Deshalb wird zu einer weitgehenden Unterdrückung der DNA-Synthese die Dauer von 2 - 3 Zellzyklen benötigt. In dieser Zeit können sich die Zellen noch 1 - 3 mal teilen (ohne Beleg). Selbst wenn man eine unvollständige Blockade der Zellvermehrung durch Ovalicin annimmt, widersprechen diese Beobachtungen einer zellzyklusspezifischen Arretierung der Zellen durch Ovalicin.

Gibt es noch eine andere Möglichkeit, diese langen Verzögerungsphasen bei Ausprägung der Ovalicinwirkung zu interpretieren? Ovalicin zeigt große Ähnlichkeit zu Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon), einem Hemmstoff der Polyaminbiosynthese (Williams-Ashman und Schenone, 1972), in seiner Wirkung auf Lymphozyten (vgl. Kap. C4) und permanente Zelllinien. In Gegenwart von Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon) können sich 3T3-Zellen (Mäusefibroblastenlinie) oder SV3T3-Zellen (SV40-Virus transformierte 3T3-Zellen) noch mindestens 2 mal teilen (Rupniak und Paul, 1978a). Die Vermehrungshemmung beginnt auch hier erst nach Ablauf eines Zellzyklus (Tab. 21). Die DNA-Synthese von Serum-stimulierten Rattenembryofibroblasten wird durch Methylglyoxal-bis-(guanylhydrazon) während des ersten Zellzyklus nach Toxinzugabe nicht beeinflusst (Rupniak und Paul, 1978a, b). Nach Rupniak und Paul reichen die intrazellulären Polyaminvorräte aus, die Zellen mindestens noch 1 Zellzyklus, trotz Ausfall der Polyaminsynthese, mit normaler Geschwindigkeit durchlaufen zu lassen (Rupniak und Paul, 1978a).

In Analogie zu den oben genannten Ergebnissen ist es möglich, daß Ovalicin die Synthese einer Zellkomponente hemmt, von der die Zelle einen gewissen Vorrat besitzt. Wird eine kritische Konzentration dieser Komponente unterschritten, tritt Hemmung verschiedener Zellfunktionen ein. Da einzelne Zelltypen unterschiedlich rasch gehemmt werden, müßte man einen unterschiedlichen Gehalt an der Zellkomponente in den Zellen postulieren.

Welche Komponente kommt in Betracht?

### C. Eingrenzung des Wirkorts

Gibt man Ovalicin gleichzeitig mit Con A zu Mäusemilzzellen, so findet man von den untersuchten Meßparametern den Uridineinbau am frühesten gehemmt (Fig. 38). Maximale Reduktion ist wahrscheinlich bereits nach 12 stündiger Einwirkung erreicht (Fig. 38b). Bevorzugt wird dabei die Synthese ribosomaler RNA - eines wichtigen Bestandteils der Ribosomen - gehemmt (Fig. 42, 43). Verhindert also Ovalicin die Neusynthese von Ribosomen? Sind die übrigen durch Ovalicin ausgelösten Effekte Auswirkungen dieser Hemmung? Eine Antwort sollte man beim Vergleich der Wirkungen Ovalicins und eines Hemmstoffs der rRNA-Synthese erhalten:

#### Wirkung auf die RNA-Synthese

Actinomycin D: Niedrige Dosen Actinomycin D inhibieren in verschiedenen Systemen bevorzugt die Synthese ribosomaler RNA (Kay et al., 1969; Clark et al., 1967; Perry und Kelley, 1968). In Phytohämagglutinin-stimulierten menschlichen Blulymphozyten wird die Synthese von 18 S und 28 S rRNA nach 22 stündiger Actinomycin D Einwirkung (0.05 µg/ml mit dem Mitogen zugesetzt) vollständig ausgeschaltet. Die Synthese von hrRNA und RNA, die im Bereich von 4 S sedimentiert, wird dagegen nicht verhindert (Kay et al., 1969). Die Bildung von 5S RNA, einer weiteren RNA-Komponente des eukariotischen Ribosoms (Galibert et al., 1967) ist trotz völliger Hemmung von 18 S und 28 S rRNA durch Actinomycin D in L-Zellen (in Suspensionskultur gehaltene Mäusefibroblasten) möglich (Perry und Kelley, 1968).

Ovalicin: Die Synthese einzelner RNA-Spezies wird durch Ovalicin wahrscheinlich mit der gleichen Selektivität wie durch Actinomycin D gehemmt. Am stärksten ist die Synthese von 18 S und 28 S rRNA reduziert (Fig. 42, 43; Tab. 17). Allerdings ist die Hemmung mit maximal 50 % bei weitem nicht vollständig. Geht man jedoch davon aus, daß nur rund 60 % der Zellen einer Hemmung zugänglich sind (vgl. Teil A der Diskussion), so berechnet sich die Reduktion der Synthese auf über 80 %. Die Biosynthese von tRNA (4 S RNA) und hochmolekularer RNA wird am wenigsten gehemmt. Es ist unklar ob die Synthese von 5 S RNA durch Ovalicin gehemmt wird. Die Syn-

thesehemmung der RNA des 5 S Bereichs nimmt eine Mittelstellung ein. Dies könnte man dadurch erklären, daß dieser RNA-Gipfel ein Gemisch aus 5 S und 5.8 S rRNA darstellt, wobei nur die Synthese einer der beiden Spezies verhindert ist. 5.8 S rRNA sollte ähnlich stark wie die Synthese der großen rRNA-Spezies gehemmt werden, da sie gemeinsam mit der 5.8 S rRNA als 45 S RNA-Vorläufer im Nukleolus gebildet werden (Pene et al., 1968).

#### Wirkung auf die Proteinsynthese

Actinomycin D: Obwohl bereits kurz nach Phytohämagglutinin-Zugabe die Synthese ribosomaler RNA in menschlichen Blutlymphozyten bevorzugt stimuliert wird (Cooper, 1972), bestreiten die sich zu Blastzellen vergrößernden Lymphozyten die Zunahme ihrer Proteinsyntheseaktivität 12 - 16 Stunden (= frühe Proteinsynthese) nach Mitogenkontakt hauptsächlich durch Aktivierung bereits im ruhenden Lymphozyten vorhandener, inaktiver Ribosomen (Cooper und Braverman, 1977a) und durch Erhöhung der Proteinsyntheserate pro aktivem Ribosom (Kay et al., 1971). Tatsächlich findet diese Aktivierung der Proteinsynthese auch in Abwesenheit von rRNA-Synthese statt. Actinomycin D hemmt in einer Konzentration von 0.025 µg pro ml, die die rRNA-Synthese praktisch vollständig unterdrückt, die Proteinsynthese in menschlichen Blutlymphozyten 18 Stunden nach Mitogen und Toxinzugabe, gemessen am [<sup>14</sup>C]Phenylalanineinbau in säurefällbares Zellysat, nur zu rund 15 % (Kay und Lindsay, 1973; vgl. dazu auch Kay et al., 1969; Kay und Cooke, 1971). Ebenso erfolgt die Aktivierung freier Ribosomen, gemessen an der Bildung von Polysomen, in Gegenwart von 0.05 µg/ml Actinomycin D (Cooper und Braverman, 1977a). Da voll aktivierte Lymphozyten im Mittel einen 3 - 4 mal höheren RNA-Gehalt als ruhende Lymphozyten haben (Sören und Bieberfeld, 1973; Peters und Hausen, 1971) und rRNA 80 - 85 % der Gesamt-RNA ausmacht (Sören und Bieberfeld, 1973; Cooper, 1972), ist eine erhebliche Neusynthese ribosomaler RNA beim Übergang vom kleinen Lymphozyten zur ausgereiften Blastzelle nötig. Verhindert man die Neusynthese von Ribosomen in menschlichen Blutlymphozyten durch Actinomycin D (0.05 µg/ml), so findet man 2 Tage nach Stimulation keine weitere Steigerung der Proteinsyntheseaktivität im Vergleich zum Aminosäureeinbau nach einem

Tag. Kontrollzellen verdoppeln dagegen ihre Proteinsyntheserate im gleichen Zeitraum (Kay et al., 1969). Offensichtlich wird die Zunahme der Proteinsynthese nach Abschluß der Stimulierung inaktiver Ribosomen durch Ribosomenneusynthese ermöglicht.

Ovalicin: Ovalicin, das wie Actinomycin D die Translation nicht direkt beeinflußt (Tab. 10, 11; Cooper und Braverman, 1977b), hemmt die frühe Proteinsynthese in Con A stimulierten Mäusemilz- zellen 12 Stunden nach Con A-Zugabe mit einer Reduktion um 20 - 25 % nur wenig (Fig. 28, 29; Tab. 9). Eine erste Wirkung von Ovalicin auf die Proteinsynthese zeigt sich 8 - 10 Stunden nach Mitogen- und Toxinzugabe und ist damit signifikant später als die erste Hemmung des Uridineinbaus feststellbar (Fig. 28, vgl. Fig. 38). Es ist im Hinblick auf die oben genannte Theorie verständlich, daß durch Verlängerung der Einwirkungsdauer des Toxins in die Vorinkubationsphase der Lymphozyten hinein die Hemmung der frühen Proteinsynthese praktisch nicht erhöht wird (Tab. 13), da ja für die zwischen der 8. und 14. Stunde nach Stimulation gemessene Proteinsynthese keine Ribosomenneusynthese nötig ist<sup>+</sup>). In einem Zeitraum, in dem die Aktivierung der bereits in der Ruhezelle vorhandenen Ribosomen weitgehend abgeschlossen ist (12 - 16 Stunden nach Phytohämagglutinin-Stimulation von menschlichen Blutlymphozyten), die Proteinsyntheserate jedoch weiter ansteigt (Fig. 28), sollte Ovalicin verstärkt auf die Proteinsynthese wirken, wenn es die Neusynthese von Ribosomen verhindert. Bis zur 1/2. Stunde nach Con A-Zugabe ist die Proteinsynthese - gemessen zwischen der 30. und 36. Stunde - besonders empfindlich gegenüber Ovalicin. Danach fällt die Wirksamkeit von Ovalicin rasch ab (Fig. 31). Das gleiche Ergebnis erbrachten Versuche ohne Beleg, die in Kapitel C3c aufgeführt wurden, in denen eine besondere Empfindlichkeit der Proteinsynthese zwischen der 16. und 20. Stun-

---

<sup>+</sup>) Wahrscheinlich laufen diese Vorgänge in Con A-stimulierten Mäuse milzzellen etwas früher ab als in Phytohämagglutinin-aktivierten menschlichen Blutlymphozyten, da Beginn und Maximum des Thymidin- einbaus bei Phytohämagglutinin-stimulierten peripheren Lympho- zysten deutlich später, als in Con A-stimulierten Mäusezellen be- obachtbar sind (vgl. Loeb et al., 1970).

de erkennbar war. In Gegenwart von Ovalicin findet jedoch anschließend - anders als mit Actinomycin D - immer noch eine, allerdings gegenüber der Kontrolle ohne Ovalicin verringerte Steigerung der Proteinsynthese statt (Fig. 28). Das mag, wie auch im Fall der RNA-Synthese, auf die Anwesenheit ungehemmter Populationen von Milzzellen zurückzuführen sein. Die erhöhte Hemmung der Proteinsynthese (42 Stunden nach Con A-Zugabe) korreliert gut mit dem verringerten Ribosomengehalt Ovalicin-gehemmter Zellen (Tab. 12).

Proteinsynthese scheint unabdingbare Voraussetzung für die Transformation des kleinen Lymphozyten zur großen Blastzelle zu sein (Fig. 33, 34, 36). Da bereits 24 Stunden nach Con A-Zugabe zu Mäusemilzzellen ein großer Teil der Zellen zu Blastzellen differenziert ist (Fig. 33, 34), sollte man erwarten, daß Actinomycin D, das die Aktivierung früher Proteinsynthese nicht verhindert (s.o.), keinen oder nur geringen Einfluß auf die Bildung von Blastzellen hat. Kay, Loeb und Mitarbeiter finden tatsächlich in Gegenwart von niedrigen Dosen Actinomycin D die charakteristische Transformation von Phytohämagglutinin-aktivierten menschlichen Blutlymphozyten zu Blastzellen (Kay et al., 1969; Loeb et al., 1970). Ähnliches beobachtet man bei Ovalicin. Die Bildung großer Zellen nach Con A-Stimulation von Mäuselymphozyten ist in Gegenwart von Ovalicin, zumindest bis 48 Stunden nach Toxinzugabe, nur um 15 - 25 % reduziert (Fig. 36).

#### Wirkung auf die DNA-Synthese

Actinomycin D: Niedrige Dosen Actinomycin D verhindern die durch Phytohämagglutinin induzierte DNA-Synthese in menschlichen Blutlymphozyten rund 30 Stunden nach Stimulation vollständig (Kay et al., 1969; Loeb et al., 1970). Die ersten Stunden scheinen für die Unterdrückung der DNA-Synthese nicht wichtig zu sein, da Actinomycin D - erst 6 Stunden nach Mitogengabe zugesetzt - gleich wirksam ist (Kay et al., 1969; Agarwal und Loeb, 1972). Setzt man den Hemmstoff nach dem Mitogen zunehmend später zu, kann die Induktion der DNA-Synthese immer weniger verhindert werden (Agarwal und Loeb, 1972; Kay et al., 1969). Auf die laufende DNA-Synthese schließlich hat Actinomycin D keine Wirkung. Für Replikati-

on ist daher gleichzeitige rRNA-Synthese nicht erforderlich. Ursache der DNA-Synthesehemmung bei frühzeitiger Actinomycin D Zugabe könnte der beobachtete völlige Ausfall der Synthese von DNA-Polymerase sein, die in ungehemmten Lymphozyten 2 - 3 Stunden vor Beginn des Thymidineinbaus einsetzt. Wahrscheinlich muß eine genügend große Menge Ribosomen akkumulieren, um die Expression von DNA-Polymerase und weiterer Komponenten des DNA-Syntheseapparats zu ermöglichen (Agarwal und Loeb, 1972).

Ovalicin: Ovalicin zeigt die gleiche Wirksamkeit wie Actinomycin D (Agarwal und Loeb, 1972) auf die DNA-Synthese Con A-stimulierter Mäusemilzzellen in Abhängigkeit vom Zugabezeitpunkt und wirkt nicht rasch, wenn es während laufender Replikation zugesetzt wird (Fig. 18). Dies wird durch das Unvermögen Ovalicins bestätigt, in einem zellfreien System die Polymerisation von Desoxyribonukleosidtriphosphaten zu verhindern (Tab. 8). Der im zellfreien System gefundene Defekt im DNA-Polymerisationsapparat von Kernen Ovalicin-gehemmter Zellen könnte, nach dem oben Gesagten, durch das Fehlen von DNA-Polymerase bedingt sein.

Im folgenden wird eine Hypothese entworfen, die die verschiedenen Effekte von Ovalicin miteinander verknüpft:

Ovalicin hemmt selektiv die Synthese ribosomaler RNA. Dadurch wird aus Mangel an Vorstufen die Bildung von Ribosomen verhindert. Dies wirkt sich jedoch erst relativ spät nach Mitogenkontakt auf Lymphozyten aus, da für die anfängliche Proteinsynthese die Aktivierung vorhandener Ribosomen ausreicht (Cooper und Braverman, 1977a). Dies ermöglicht sogar die Transformation des kleinen Rühelymphozyten zur bedeutend voluminöseren Blastzelle. Zu einem Zeitpunkt, in dem Neusynthese von Ribosomen für die Proteinsynthesekapazität entscheidend wird, erhöht sich die Hemmung der Proteinsynthese durch Ovalicin. Die niedrige Proteinsyntheseleistung spiegelt dann den reduzierten Ribosomengehalt der Zelle wider. Wegen fehlender Akkumulation von Ribosomen wird die Synthese von DNA-Polymerase und damit Replikation verhindert. Da dieser Vorgang weit vor Beginn der DNA-Synthese stattfindet, erklärt sich

daraus die Unwirksamkeit von Ovalicin gegenüber laufender DNA-Synthese.

Mit der Ribosomenmenge als für die Proliferation limitierender Faktor (Tab. 12) wird verständlich, daß Lymphozyten, die beim Übergang vom Ruhezustand in die metabolisch aktive Phase ihre Ribosomenzahl verdrei- oder vervierfachen müssen (Sören und Bieberfeld, 1973; Peters und Hausen, 1971), sensitiver und damit früher auf Ovalicin reagieren als exponentiell wachsende Lymphomazellen (Tab. 20), die von vornherein einen höheren RNA-Gehalt (Andreeff et al., 1978) und damit eine höhere Ribosomenmenge haben und ihre Ribosomenzahl (für 2 Tochterzellen) nur verdoppeln müssen. Zudem ist in transformierten Zellen die ribosomale RNA bedeutend stabiler als in primären Zellen. So besitzt die rRNA menschlicher Fibroblasten eine Halbwertszeit von 70 Stunden, die rRNA SV40 transformierter Zellen dagegen wird erst innerhalb von rund 700 Stunden zur Hälfte katabolisiert (Liebhaber et al., 1978). Es ist daher vorstellbar, daß im Fall der primären Mäusemilzzellen eine die Proliferation verhindernde kritische Ribosomenkonzentration nach kürzerer Zeit unterschritten wird, als in rasch wachsenden Zellen. In diesem Zusammenhang erscheint die Abnahme der Empfindlichkeit von Mäusemilzzellen gegenüber Ovalicin mit fortschreitender Inkubationsdauer plausibel (Fig. 19; Tab..6). Nachdem die Elternzellen genügend Ribosomen für die erste Teilung akkumuliert haben, erinnern die Tochterzellen in ihrem Bedarf an Ribosomen an andere rasch proliferierenden Zellen. Zur Hemmung der Tochterzellen bedarf es dann wie z.B. auch bei S49.1-Lymphomzellen einer möglicherweise über eine Zellzykluslänge hinausgreifende Ovalicineinwirkungsdauer. Diese Überlegungen lassen sich sogar weiter auf Lymphozytensubpopulationen ausdehnen. Andreeff und Mitarbeiter (1978) fanden bei unstimulierten menschlichen Blutlymphozyten der T-Reihe einen deutlich unterschiedlichen RNA-Gehalt (bis maximal  $f = 2$ ). Da daher ein Teil der Zellen wahrscheinlich auch bis zu doppelt so viel Ribosomen enthält, ist auf diesem Niveau eine subpopulationsspezifische Wirkung von Ovalicin aufgrund selektiver Hemmung von rRNA vorstellbar.

Niedrige Dosen Actinomycin D zeigen ähnliche differentielle Effekte auf DNA-Synthes und Zellvermehrung in verschiedenen Systemen (vgl. dazu Kay et al., 1969). Generell scheint die DNA-Synthese besonders empfindlich in normalerweise ruhenden Zellen zu sein. Wie bereits ausführlich beschrieben, werden DNA-Synthese und damit Zellteilung Lektin-stimulierter Blutlymphozyten schon im ersten Zellzyklus verhindert (Kay et al., 1969; Loeb et al., 1970; Agarwal und Loeb, 1972). Auch vermag Actinomycin D in niedrigen Dosen den Beginn der DNA-Synthese in explantierten Kaninchen-Nierencortexzellen (Lieberman et al., 1963) und in Lebern von Ratten nach Teilhepatektomie (Fujjoka et al., 1963) zu verhindern. Ähnlich empfindlich reagieren auch manche Zellarten, die sich gewöhnlich kontinuierlich teilen, wie synchronisierte Ehrlich-Asciteszellen (Baserga et al., 1965) und Epithelialzellen von Mäusedarmzotten (Baserga et al., 1966). Auf der anderen Seite kann Zellteilung in rasch proliferierenden Zellen trotz Hemmung der ribosomalen RNA-Synthese noch einige Zeit weiterlaufen. In Gegenwart von 0.08 µg/ml Actinomycin D können sich L-Zellen für 10 - 14 Stunden wie Zellen ohne Toxin weiter exponentiell vermehren, bevor Stillstand der Proliferation einsetzt (Perry und Kelley, 1968; Tab. 21). Auch HeLa-Zellen werden durch Actinomycin D erst nach einer Verzögerungsphase von 24 Stunden in ihrer Vermehrung angehalten (Clark et al., 1967). Nach Kay et al. (1969) kann man daraus folgende Schlüsse ziehen:

"In einigen rasch proliferierenden Zellen scheinen also genügend Ribosomen vorhanden zu sein, um mehrere Zellteilungen zu erlauben, bevor sie limitierend werden. In ruhenden Lymphozyten jedoch und vielleicht generell in ruhenden Zellen scheint der Ribosomengehalt unter einer kritischen Menge zu liegen, die für den Eintritt der Zelle in die DNA-Synthese benötigt wird."

Die unterschiedliche Hemmung von lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen durch Ovalicin kann allerdings nicht allein mit einem unterschiedlichen Ribosomengehalt oder Bedarf erklärt werden. So würde die Ribosomenkonzentration in 3T6-Zellen bei Annahme vollständiger Hemmung der Neusynthese ribosomaler RNA durch Ovalicin nach der für 50 % Hemmung der Zellproliferation benötigten Einwirkungsdauer nur noch rund 0.1 % der Ausgangskonzentration betragen,

da die Ribosomenmenge bei jeder Zellteilung auf die Hälfte reduziert würde. Möglicherweise können diese Zellen Ovalicin schlecht aufnehmen bzw. nicht metabolisch aktivieren. Da Ovalicin wahrscheinlich nicht direkt auf die rRNA-Synthese wirkt (Fig. 44), ist es denkbar, daß die hypothetische, Ovalicin-sensitive Reaktion, die der rRNA-Synthese vorgeschaltet ist, in nicht-lymphoiden Zellen relativ resistent ist.

Welche Reaktion kommt dafür in Betracht?

Es sind verschiedene Stoffwechselbedingungen in der Literatur beschrieben, die in eukariotischen Zellen zu einer selektiven Blockierung der Synthese ribosomaler RNA führen. So wird rasch und selektiv durch Hemmung der Proteinsynthese (Muramatsu et al., 1970; Shulman et al., 1977) oder nach Entzug einer essentiellen Aminosäure (Shulman et al., 1977; Grummt et al., 1976) oder Serum-mangel (Hershko et al., 1971) die Synthese ribosomaler RNA reduziert. Cycloheximid hemmt in Rattenleber die Synthese des rRNA-Vorläufers (45 S rRNA) nach 1 stündiger Einwirkung zu 70 %; nach weiteren 2 Stunden Einwirkung des Toxins wird eine Maximalhemmung von 80 % erreicht (Muramatsu et al., 1970). In Hefe beträgt die Hemmung der rRNA-Synthese 1 - 2 Stunden nach Tyrosinentzug 80 - 85 % bei einer Proteinsynthesehemmung von über 90 %, während die Synthese von mRNA und tRNA nur um 25 % bzw. 20 % reduziert ist (Warner und Gorenstein, 1978; Shulman et al., 1977). Die geringe, vergleichsweise rasch durch Ovalicin in Milzzellen ausgelöste Proteinsynthesehemmung, gemessen 12 Stunden nach Con A-Zugabe (Fig. 29), reicht daher wahrscheinlich nicht aus, die rRNA-Synthese in dem gefundenen Ausmaß nach obigen Mechanismus zu hemmen. Höhere Zellen gleichen in ihrer Reaktion auf den Aminosäureentzug Bakterien, die in einer sogenannten 'stringent response' durch selektive Reduktion der rRNA-Synthese auf die Mangelsituation reagieren (Morris und Kjeldgaard, 1968). Parallel dazu tritt das ungewöhnliche Nukleotid ppGpp auf (Cashel und Kalbacher, 1970). Eng verknüpft mit der Synthese ribosomaler RNA ist die Bildung ribosomaler Proteine, die durch Hemmung der Transkription der spezifischen 'messenger' RNAs bei Aminosäureentzug ebenfalls verhindert wird (Stephens et al., 1975). Auch in eukariotischen

Zellen wird die Synthese ribosomaler RNA und mRNA für ribosomale Proteine streng gekoppelt reguliert. Dies wurde bis jetzt allerdings nur für Hefe nachgewiesen, wo bis auf wenige Ausnahmen nach Aminosäureentzug spezifisch die Synthese der mRNAs ribosomaler Proteine ausfällt (Warner und Gorenstein, 1978). Umgekehrt wird bei Anwesenheit niedriger Dosen Actinomycin D in Rattenleber durch Ausschaltung der Synthese bestimmter mRNAs (mRNAs für ribosomale Proteine?) die Transkription der rRNA-Gene gestoppt (Lindell et al., 1978).

Die Biosynthese ribosomaler RNA ist eine grundlegende Reaktion proliferierender Zellen (Grummt et al., 1976). Sie ist mit einer Reihe von Reaktionen verknüpft, über die Änderungen der Stoffwechsellage rasch weitergegeben werden. Die Kopplung der Reaktionen ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise spielt der Gehalt der Zelle an ATP und GTP eine wichtige regulatorische Vermittlerrolle (Grummt und Grummt, 1976). Es ist also denkbar, daß Ovalicin über die Hemmung einer unbekanntenen Zielreaktion den Gehalt der Zelle an diesen Metaboliten senkt.

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um den Wirkort von Ovalicin zu finden. Die Aufklärung der Zielreaktion Ovalicins könnte einen weiteren Einblick in das komplexe Netzwerk der Regulation in höheren Zellen geben, im besonderen in die noch weitgehend unbekanntenen biochemischen Vorgänge der Immunantwort.

Anhang

Vergleich der Mitogenstimulation von Mäusemilzzellen in Kultur-  
röhrchen und Zellkulturflaschen. - Wirksamkeit von Ovalicin

Wegen des größeren Zellbedarfs für biochemische Untersuchungen und der - zumindest in meinen Händen - schlechten Reproduzierbarkeit bei Mitogenstimulation von Milzzellen in kleinen Kulturröhrchen (vgl. Fig. 47 mit Tab. 19) wurden in dieser Arbeit Lymphozyten in 3 - 45 ml Medium kultiviert statt in 0.9 ml, wie in Weiner (1976) beschrieben (s. Methode 4a $\beta$ ). Zuvor mußte jedoch geklärt werden, ob die Bedingungen für optimale Stimulation der Milzzellen durch Con A in Röhrchen und ihre Hemmung durch Ovalicin sich auf das Flaschensystem übertragen lassen.

In Abhängigkeit von der verwendeten Serumcharge findet man für das Röhrchensystem in einem relativ engen Bereich der Lektinkonzentration optimale Stimulation von Milzzellen durch Con A (Weiner, 1976; Ling und Kay, 1975). Unter nahezu identischen Bedingungen lassen sich Lymphozyten im Flaschensystem stimulieren (2.5 % Serum M (s. Material 3a): 1  $\mu\text{g/ml}$  Con A bei  $2 \times 10^6$  Zellen/ml; 5 % Serum E (s. Material 3a): 1 oder 2  $\mu\text{g/ml}$  Con A bei  $2 \times 10^6$  Zellen/ml bzw. 1  $\mu\text{g/ml}$  Con A bei  $1 \times 10^6$  Zellen/ml; vgl. dazu Weiner, 1976). Im Gegensatz zu den Befunden von Weiner (1976) scheint die Wirkung von Ovalicin unabhängig von der Con A-Konzentration zu sein, sodaß geringes Abweichen von den optimalen Stimulationsbedingungen keine Schwankungen der Ovalicinhemmung nach sich zieht. Als Beispiel wurde die Ovalicinhemmung des Uridineinbaus, der als Meßparameter für die Stimulation diente, in Abhängigkeit von der Con A-Konzentration in Figur 46 dargestellt.

Auch scheinen Lymphozyten, in Röhrchen kultiviert, etwas empfindlicher gegenüber Ovalicin zu sein. Mißt man den Thymidineinbau von Lymphozyten - jeweils unter optimalen Bedingungen in Röhrchen oder Flaschen stimuliert - in Gegenwart verschiedener Ovalicinkonzentrationen, so findet man halbmaximale Hemmung (der Plateauwert wurde als Maximum genommen) bei  $0.6 \times 10^{-10}$  M bzw.  $4 \times 10^{-10}$  M (Fig. 47). Zudem ist die Hemmung größer (Plateauwerte: Röhrchen 66 %; Flaschen 48 %; Fig. 47). Dieser Unterschied im Ausmaß der

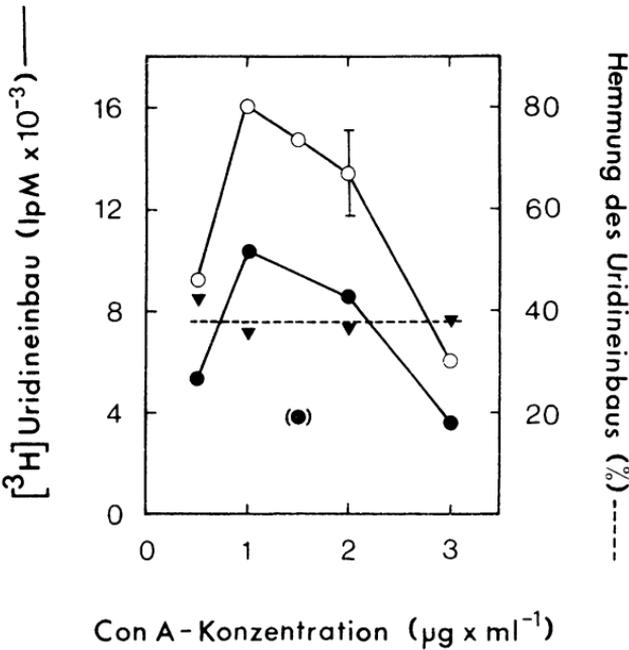


Fig. 46 Wirkung von Ovalicin auf den Uridineinbau Con A-stimulierter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Con A-Konzentration

Jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen wurden nach 11 stündiger Vorinkubation durch Zugabe der in der Abszisse angegebenen Con A-Konzentrationen und  $10^{-5}$  M (Endkonzentration) 2-Mercaptoäthanol stimuliert. Ein Teil der Proben erhielt gleichzeitig Ovalicin in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M. 36 h später wurden Proben entnommen (s. Methode 7a),  $1 \mu\text{Ci/ml}$   $[^3\text{H}]$ Uridin ( $0.2 \text{ Ci/mMol}$ ) zugesetzt und nach 1 h die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

- - Ovalicin
- + Ovalicin ( $2 \times 10^{-7}$  M)
- ▼ Hemmung des Uridineinbaus

Hemmung ist jedoch wahrscheinlich nicht signifikant (vgl. dazu inset Fig. 48: Die Hemmung des Thymidineinbaus durch Ovalicin ist gleich groß, unabhängig davon ob die Zellen während der gesamten

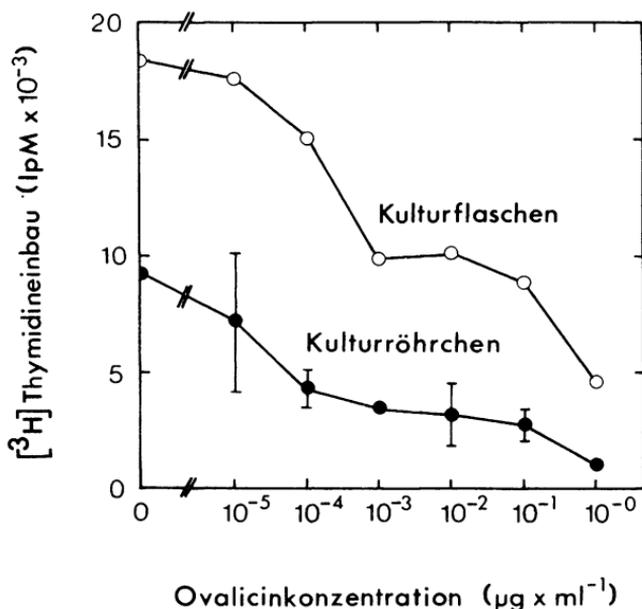


Fig. 47 Einfluß des Kulturgefäßes auf die Hemmung des Thymidineinbaus Con A-stimulierter Lymphozyten durch Ovalicin

$1.35 \times 10^6$  Zellen/ml (je 3 Parallelansätze) bzw.  $45 \times 10^6$  Zellen ( $2.7 \times 10^6$ /ml) wurden ohne Vorinkubation durch Zugabe von Con A in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{g}$  bzw.  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  in Kulturröhrchen (●) bzw. Kulturfラスchen (O) in Medium mit 5 % fötalem Kälberserum in Gegenwart verschiedener Ovalicinkonzentrationen stimuliert. 36 h nach Mitogenzugabe wurden den Flaschen je  $2 \times 0.9 \text{ ml}$  Proben entnommen und in Kulturröhrchen pipettiert (s. Methode 7a), allen Proben  $1 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]Thymidin ( $6.7 \text{ Ci}/\text{mMol}$ ) zugesetzt und nach 9 h die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a $\beta$ , 10a).

Inkubation oder nur während der radioaktiven Markierung in Röhrchen waren).

Als Ursache für die unterschiedliche Empfindlichkeit ist folgendes denkbar: Lymphozytensubpopulationen adhärieren unterschiedlich stark an Glas- und Kunststoffoberflächen (vgl. Julius et al., 1973; Ling und Kay, 1975). Zur Bestimmung von Zellparametern (z.

B. Einbau von radioaktiven Vorläufern, Zellzahl usw.) müssen im Flaschensystem der aufgewirbelten Zellsuspension Proben entnommen werden. Im Gegensatz zur Röhrenkultur, wo durch starkes Aufwirbeln (s. Weiner, 1976) praktisch alle Zellen erfaßt werden können, bleiben bei Kultivierung der Zellen in Flaschen die nach dem Umschwenken (s. Methode 7a) noch anhaftenden Zellen im Kulturgefäß zurück. Um das Ausmaß dieses Effekts zu bestimmen, wurden

Tab. 24 Hemmung des Uridineinbaus suspendierbarer und anhaftender Lymphozyten durch Ovalicin

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Fig. 38. Zur Bestimmung des säureunlöslichen Zellysats suspendierbarer und anhaftender Zellen wurden die Zellen vorsichtig durch Umschwenken suspendiert, auf das Filter gebracht und der Zellrasen mit 2 ml 0.85 % NaCl-Lösung gewaschen. Dann wurden weitere 2 ml 0.85 % NaCl-Lösung zugesetzt und der Zellrasen wie in Fig. 38 beschrieben, abgeschabt. Weitere Aufarbeitung s. Fig. 38.

	$[^3\text{H}]$ Uridineinbau (IpM)		Hemmung (%)
	- Ovalicin	+ Ovalicin	
leicht suspendierbare Zellen	56 834 $\pm$ 6 947	45 689 $\pm$ 641	20
anhaftende Zellen	2 316 $\pm$ 727	1 993 $\pm$ 287	14
suspendierbare und anhaftende Zellen	55 976 $\pm$ 1 715	45 531 $\pm$ 89	19

wurden Milzzellen in Petrischälchen aus Kunststoff durch Con A stimuliert und der Uridineinbau der anhaftenden und der leicht suspendierbaren Zellen gemessen (Tab. 24). Dabei wurde nur rund 5 % des Gesamteinbaus in säureunlösliches Zellysats in der Fraktion der anhaftenden Zellen gefunden. In Gegenwart von Ovalicin ist der Einbau in beide Fraktionen vergleichbar stark reduziert

(Tab. 24). Mit diesem Versuch kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß die Zellen zu anderen Zeiten nach Mitogenzugabe 'klebriger' sind (dies ist vermutlich in den ersten Stunden nach Mitogenzugabe der Fall; Beobachtungen ohne Beleg) und so sich stärkere Abweichungen vom Röhrchensystem ergeben. Dies sollte man besonders bei der quantitativen Interpretation von Einbaukinetiken im Auge behalten (z.B. Fig. 9, 28; jedoch nicht bei Fig. 38).

Von zahlreichen Autoren wurde bereits die mitogene bzw. die zu Lektinen synergistische Wirkung von 2-Mercaptoäthanol beschrieben (s. z.B. Goodman und Weigle, 1977; Lembke und Opitz, 1976; Opitz et al., 1978). Im Röhrchen- wie auch im Flaschensystem wird der Thymidineinbau in Con A stimulierte Lymphozyten durch  $10^{-5}$  M 2-Mercaptoäthanol 2 - 3 fach gesteigert (Fig. 48; Weiner, 1976). Selbst zu Beginn eines 12 stündigen [ $^3$ H]Thymidinpulses zugesetzt (36 Stunden nach Con A-Zugabe) vermag 2-Mercaptoäthanol den Thymidineinbau in säurefällbares Zellysat deutlich zu stimulieren (vgl. Fig. 48a mit Fig. 48b). Im Gegensatz zu den Befunden zu Weiner (1976) wird die Wirkung von Ovalicin nicht beeinträchtigt. Vielmehr ist die Hemmung des Thymidineinbaus durch Ovalicin in Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol leicht erhöht (inset Fig. 48b). Noch deutlicher ist dieser Effekt, wenn man als Parameter für Zellproliferation den Leucineinbau wählt (ohne Beleg).

Ein großer Vorteil des Flaschensystems ist die gute Reproduzierbarkeit der Stimulation von Lymphozyten bei Parallelansätzen. Die Schwankungen zwischen Parallelproben aus 1 Kulturflasche bzw. aus 2 identisch angesetzten Flaschen lagen in der Regel unter 5 % (Tab. 6, 19). Dagegen wichen die Parallelproben im Röhrchensystem des in Figur 47 dargestellten Versuchs im Durchschnitt um 26 % vom Mittelwert ab (vgl. auch Fig. 48a,b: t = 0). Die Ursache dieses Phänomens wurde nicht weiter untersucht, jedoch scheinen die ersten Stunden nach Mitogenkontakt in Röhrchen für diese Schwankungen verantwortlich zu sein (Fig. 48).

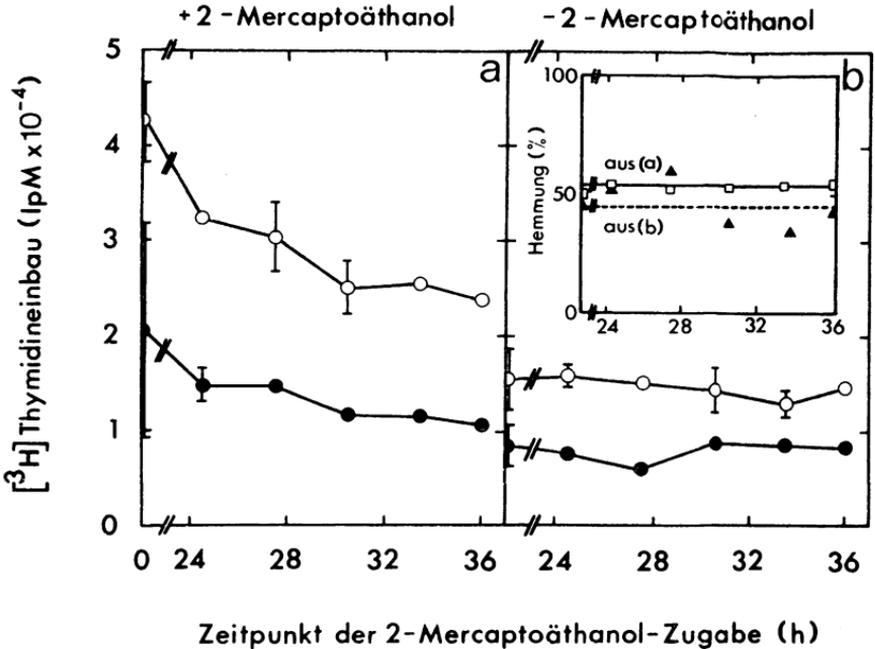


Fig. 48 Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf die Hemmung des Thymidineinbaus Con A-stimulierter Lymphozyten durch Ovalicin

2 Ansätze mit je  $100 \times 10^6$  Zellen wurden ohne Vorinkubation in Medium mit 5 % fötalem Kälberserum (s. Material 3a) durch Zugabe von Con A (Endkonzentration:  $2 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Gleichzeitig mit dem Mitogen erhielt ein Ansatz Ovalicin in einer Endkonzentration von  $7 \times 10^{-7}$  M. Zu den in der Abszisse angegebenen Zeiten wurden den Flaschen je  $4 \times 0.9$  ml Zellsuspension entnommen und in Kulturrohrchen pipettiert (s. Methode 7a). Die Hälfte der Proben erhielt in  $10 \mu\text{l}$  BSS-Puffer (s. Material 3a) 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration:  $10^{-5}$  M); den Kontrollen wurde das gleiche Volumen BSS zugesetzt. 36 h nach Mitogenzugabe wurde  $1 \mu\text{Ci } [^3\text{H}]$ Thymin ( $6.7 \text{ Ci/mMol}$ ) zugegeben (s. Methode 7c) und nach 12 h die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (s. Methoden 8a, 10a).

- - Ovalicin
- + Ovalicin ( $7 \times 10^{-7}$  M)
- Hemmung des Thymidineinbaus - 2-Mercaptoäthanol
- ▲ Hemmung des Thymidineinbaus + 2-Mercaptoäthanol

Literaturverzeichnis

- Agarwal, S.S. and Loeb, L.A. (1972) "Studies on the Induktion of DNA Polymerase during Transformation of Human Lymphocytes" *Cancer Res.* 32, 107 - 113
- Ahern, T. and Kay, J.E. (1973) "The Control of Protein Synthesis during the Stimulation of Lymphocytes by Phytohaemagglutinin. II. Studies with Cell Free Systems", *Biochim. Biophys. Acta* 331, 91 - 101
- Ahern, T., Taylor, G.A. and Sanderson, C.J. (1976) "An Evaluation of an Assay for DNA Synthesis in Lymphocytes with [<sup>3</sup>H]Thymidine and Harvesting onto Glass Fibre Filter Discs", *J. Immunol. Meth.* 10, 329 - 336
- Aisenberg, A.C. and Murray, C. (1971) "Size and Density Analysis of Rodent Lymphoid Cells", *J. Immunol.* 107, 284 - 288
- Andersson, J., Möller, G. and Sjöberg, O. (1972a) "B-Lymphocytes Can Be Stimulated by Concanavalin A in the Presence of Humoral Factors by T-Cells", *Eur. J. Immunol.* 2, 99 - 101
- Andersson, J., Möller, G. and Sjöberg, O. (1972b) "Selective Induction of DNA Synthesis in T and B Lymphocytes", *Cell. Immunol.* 4, 381 - 393
- Andersson, J., Möller, G. and Sjöberg, O. (1972c) "Mitogens as Probes for Immunocyte Activation", *Transplant. Rev.* 11, 131 - 177
- Andersson, J. and Melchers, F. (1974) "Maturation of Mitogen-Activated Bone Marrow Derived Lymphocytes in the Absence of Proliferation", *Eur. J. Immunol.* 4, 533 - 539
- Andersson, J., Coutinho, A., Lernhardt, W. and Melchers, F. (1977) "Clonal Growth and Maturation to Immunoglobulin Secretion in vitro of every Growth-Inducible B Lymphocyte", *Cell* 10, 27 - 34
- Andersson, J., Coutinho, A. and Melchers, F. (1978) "The Switch from IgM to IgG Secretion in Single Mitogen-Stimulated B Cell Clones", *J. Exp. Med.* 147, 1744 - 1754
- Andreef, M., Beck, J.D., Darzynkiewicz, Z., Tragonos, F., Gupta, S. and Melamed, M.R. (1978) "RNA Content in Human Lymphocyte Subpopulations", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1938 - 1942
- Arrenbrecht, S. and Lazfary, S. (1970) "Effect of Immunosuppressive Agent Ovalicin on the Kinetics of Antibody Formation", *Agents and Actions* 1, 221 - 226

- Baserga, R., Estensen, R.D. and Petersen, R.O. (1965) "Inhibition of DNA-Synthesis in Ehrlich Ascites Cells by Actinomycin D II. The Presynthetic Block in the Cell Cycle"  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1141 - 1148
- Baserga, R., Estensen, R.D. and Petersen, R.O. (1966) "Delayed Inhibition of DNA-Synthesis in Mouse Jejunum by Low Doses of Actinomycin D", J Cell Physiol. 68, 177 - 184
- Benecke, B.-J. and Penman, S. (1977) "A New Class of nucleolar RNA Molecules Synthesized by a Type I RNA-Polymerase in HeLa-Cells", Cell 12, 939 - 946
- Bensadoun, A, and Weinstein, D. ;1976) "Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials", Analyt. Biochem. 70, 241 - 250
- Benz, W.C. and Strominger, J.L. (1975) "Viral and Cellular DNA Synthesis in Nuclei from Human Lymphocytes Transformed by Epstein-Barr Virus"  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2413 - 2417
- Borel, J.F., Lazafy, S. and Stähelin, H. (1974) "Immunosuppressive Effects of Ovalicin-Semicarbozone", Agents and Actions 4(5), 357 - 363
- Borel, J.F. and Wiesinger, D. (1976) "Effect of Cyclosporin A on Murine Lymphoid Cells" in "Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation" (Lucas, D.O., ed.), Academic Press, New York, pp. 716 - 718
- Borel, J.F., Feurer, C., Magnee, C. and Stähelin H. (1977) "Effects of a New Anti-Lymphocytic Peptide Cyclosporin A in Animals", Immunology 32, 1017 - 1025
- Brooks, R.F. (1977) "Continous Protein Synthesis is Required to Maintain the Probability of Entry into S-Phase", Cell 12, 311 - 317
- Carson, D.A., Kaye, J. and Seegmiller, J.E. (1977) "Lymphospecific Toxicity in Adenosine Deaminase Deficiency and Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency: Possible Role of Nucleoside Kinase(s)",  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5677 - 5681
- Carson, D.A., Kaye, J. and Seegmiller, J.E. (1978) "Differential Sensitivity of Human Leukemic T Cell lines and B Cell Lines to Growth Inhibition by Deoxyadenosine"  
J. Immunol. 121, 1726 - 1752
- Cashel, M. and Kalbacher, B. (1970) "The Control of Ribonucleic Acid synthesis in Escherichia coli. V. Characterization of a Nucleotide Associated with the Stringent response", J. Biol. Chem. 245, 2309 - 2318

- Claman, H.N. (1972) "Corticosteroids and Lymphoid Cells",  
New England J. Med. 287, 388
- Clark, A.M., Love, R., Studzinski, G.P. and Ellem, K.A.O. (1967)  
"A Correlated Morphological and Functional Study of the  
Effects of Actinomycin D on HeLa Cells",  
Exp. Cell Res. 45, 106 - 119
- Clark, J.H. and Peck, E.J. (1978) "Steroid Hormone Receptors -  
Basic Principles and Measurements" in "Receptors and  
Hormone Action" (O'Malley, B.W. and Birnbaumer, L., eds.)  
Vol. 1, Academic Press, New York, p 383
- Cleaver, J.E. (1969) "Repair Replication of Mammalian Cell DNA:  
Effects of Compounds that Inhibit DNA Synthesis or Dark  
Repair", Rad. Res. 37, 334 - 348
- Coffino, P., Gray, J.W. and Tomkins, G.M. (1975) "Cyclic AMP, a  
Nonessential Regulator of the Cell Cycle",  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 878 - 882
- Cooper, H.L. (1968) "Ribonucleic Acid Metabolism in Lymphocytes  
Stimulated by Phytohaemagglutinin. II. Rapidly Synthesized  
ribonucleic Acid and the Production of the Ribosomal ribo-  
nucleic Acid", J. Biol. Chem. 243, 34 - 43
- Cooper, H.L. (1969) "Alteration in RNA Metabolism in Lymphocytes  
during the Shift from Resting State to Active Growth" in  
"Biochemistry of Cell Division" (Baserga, R., ed.),  
Springfield, Ill., pp. 91 - 112
- Cooper, H.L. (1970) "Control of Synthesis and Wastage of Ribosomal  
RNA in Lymphocytes", Nature 227, 1105 - 1107
- Cooper, H.L. and Gibson, E.M. (1971) "Control of Synthesis and  
Wastage of Ribosomal RNA. II. The Role of Protein Synthesis",  
J. Biol. Chem. 246, 5059 - 5066
- Cooper, H.L. (1972) "Studies on RNA Metabolism during Lymphocyte  
Activation", Transplant. Rev. 11, 3 - 38
- Cooper, H.L. and Braverman, R. (1977a) "Free Ribosomes and Growth  
Stimulation in Human Peripheral Lymphocytes: Activation  
of Free Ribosomes as an Essential Event in Growth Induc-  
tion", J. Cell Physiol. 92, 213 - 226
- Cooper, H.L. and Braverman, R. (1977b) "The Mechanism by which  
Actinomycin D Inhibits Protein Synthesis in Animal Cells",  
Nature 269, 527 - 529
- Coutinho, A., Möller, G., Andersson, J. and Bullock, W.W. (1973)  
"In vitro Activation of Mouse Lymphocytes in Serum-Free  
Medium: Effect of T and B Cell Mitogens on Proliferation  
and Antibody Synthesis", Eur. J. Immunol. 3, 299 - 306

- Decker, J.M. and Marchalonis, J.J. (1977) "Molecular Events in Lymphocyte Differentiation: Stimulation of Nonhistone nuclear Protein Synthesis in Rabbit Peripheral Blood Lymphocytes by Antiimmunoglobulin", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 74, 584 - 591
- Dickinson, Rosenblum and Hamilton (1965), *Pediatrics* 36, 2, zitiert in "Handbook of Biochemistry", 2nd edition (1973), CRC-Press
- Dingman, L. and Peacock, A. (1968) "Analytical Studies on Nuclear ribonucleic Acid Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis", *Biochemistry* 7, 659 - 674
- Dutton, R.W. and Mishell, R.I. (1967) "Cell Populations and Cell Proliferation in the *in vitro* Response of Normal Mouse Spleen to Heterologous Erythrocytes", *J. Exp. Med.* 126, 443 - 454
- Edenberg, H.J. and Huberman, J.A. (1975) "Eukariotic Chromosome Replication", *Annual Review of Genetics* 9, 245 - 285
- Elfenbein, G.J. and Gelfand, M.C. (1975) "Proliferation of Mouse Bone Marrow Derived Lymphocytes *in vitro*: On the Mechanism of Response to Concanavalin A and Phytohaemagglutinin", *Cell. Immunol.* 17, 463 - 476
- Emerson Jr, C.P. (1971) "Regulation of the Synthesis and Stability of Ribosomal RNA during Contact Inhibition of Growth", *Nature New Biol.* 232, 101 - 106
- Fedoroff, N.V. (1979) "On Spacers", *Cell* 16, 697 - 710
- Ferber, E., Reilly, C.E., De Pasquale, G. and Resch, K. (1974) "Lymphocyte Stimulation by Mitogens: Increase in Membrane Fluidity by Changes of Fatty Acid Moieties of Phospholipids" in "Proc. 8th Leucocyte Culture Conf. (Lindahl, Kiessling, K. and Osoba, D., eds.) p. 529
- Fillingame, R.H. and Morris, D.R. (1973) "Polyamine Accumulation during Lymphocyte Transformation and its Relation to the Synthesis, Processing and Accumulation of Ribonucleic Acid", *Biochemistry* 12, 4479 - 4487
- Fillingame, R.H., Jorstad, C.M. and Morris, D.R. (1975) "Increased Cellular Levels of Spermidine or Spermine are Required for Optimal DNA Synthesis in Lymphocytes activated by Concanavalin A", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4042 - 4045
- Folch, H., Yoshinaga, M. and Waksman, B.H. (1973) "Regulation of Lymphocyte Responses *in vitro*: III. Inhibition by Adherent Cells of the T-Lymphocyte Response to Phytohaemagglutinin", *J. Immunol.* 110, 835 - 839

- Frelinger, J.A. (1977) "Ia-Bearing Cells Promote the Concanavalin A Mitogenic Response of Ia-Negative T Cells",  
Eur. J. Immunol. 7, 447 - 450
- Fridland, A. (1977) "Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Chain Initiation: A New Mode of Action for 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine in Human Lymphoblasts", Biochemistry 16, 5308 - 5312
- Fujioka, M., Koga, M. and Lieberman, I. (1963) "Metabolism of Ribonucleic Acid after Partial Hepatectomy",  
J. Biol. Chem. 238, 3401 - 3406
- Galibert, F., Lelong, J.C., Larsen, C.J. and Boiron, M. (1967) "Position of 5 S RNA among Cellular Ribonucleic Acids",  
Biochim. Biophys. Acta 142, 89 - 98
- Gautschi, J.R. and Kern, R.M. (1973) "DNA Replikation in Mammalian Cells in the Presence of Cycloheximid",  
Exp. Cell Res. 80, 15 - 26
- Gehring, U., Universität Heidelberg, persönliche Mitteilung
- Gerhart, S., Mills, G., Monticone, V. and Paetkau, V. (1976) "Quantitative Analysis of the Proliferative Activity Induced in Murine Thymocytes by Concanavalin A",  
J. Immunol. 117, 1314 - 1319
- Golub, E.S. (1977) "The Cellular Basis of the Immune Response. A Approach to Immunobiology", Sinauer Associates Inc.,  
Sunderland, Mass. USA
- Goodman, M.G. and Weigle, W.O. (1977) "Nonspecific Activation of Murine Lymphocytes. I. Proliferation and Polyclonal Activation Induced by 2-Mercaptoethanol and  $\alpha$ -Thioglycerol",  
J. Exp. Med. 145, 473 - 489
- Grummt, I. and Grummt, F. (1976) "Control of Nucleolar RNA Synthesis by the Intracellular Pool Sizes of ATP and GTP",  
Cell 7, 447 - 453
- Grummt, F. (1978) "Diadenosine 5',5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate Triggers Initiation of in vitro DNA Replication in Baby Hamster Kidney Cells",  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371 - 375
- Gunther, G.R., Wang, J.L. and Edelman, G.M. (1974) "The Kinetics of Cellular Commitment during Stimulation of Lymphocytes by Lectins", J. Cell Biol. 62, 366 - 377
- Hank, S.I., Hollenberg, M.D. and Snyder, S.H. (1974) " $\alpha$ -Hydrazino-ornithine Blocks Net Synthesis of Putrescine but not of RNA and DNA", Nature 249, 250 - 251

- Harris, A.W. (1970) "Differentiated Functions Expressed by Cultured Mouse Lymphoma Cells. I. Specificity and Kinetics of Cell responses to Corticosteroids", *Exp. Cell Res.* 60, 341 - 353
- Harris, G. and Olsen, I. (1976) "Cell Division and Deoxyribonucleic Acid (DNA) Synthesis in Cultures of Stimulated Lymphocytes", *Immunology* 31, 195 - 204
- Hartmann, G.R., Richter, H., Weiner, E.M. and Zimmermann, W. (1978) "On the Mechanism of Action of the Cytostatic Drug Anguidine and of the Immunosuppressive Agent Ovalicin, Two Sesquiterpenes from Fungi", *Planta medica* 34, 231 - 252
- Hausen, P. and Stein, H. (1968) "On the Synthesis of RNA in Lymphocytes Stimulated by Phytohaemagglutinin", *Eur. J. Biochem.* 4, 401 - 406
- Hauser, H., Knippers, R., Schäfer, K.P., Sons, W. and Unsöld, H.-J. (1976) "Effect of Colchicine on Ribonucleic Acid Synthesis in Concanavalin A-Stimulated Bovine Lymphocytes", *Exp. Cell Res.* 102, 79 - 84
- Hauser, H., Knippers, R. and Schäfer, K.P. (1978) "Increased Rate of RNA-Polyadenylation. An Early Response in Concanavalin A Activated Lymphocytes", *Exp. Cell Res.* 111, 175 - 184
- Hershey, H., Stieber, J. and Mueller, G.C. (1973) "Effect of Inhibiting the Cellular Synthesis of RNA, DNA and Protein on DNA Replicative Activity of Isolated S-Phase Nuclei", *Biochim. Biophys. Acta* 312, 509 - 517
- Hershko, A., Mamont, P., Shields, R. and Tomkins, G.M. (1971) "Pleiotypic Response", *Nature New Biol.* 232, 206 - 211
- Horibata, K. and Harris, A.W. (1970) "Mouse Myelomas and Lymphomas in Culture", *Exp. Cell Res.* 60, 61 - 77
- Hünig, T. (1973) "Autoradiographische Untersuchungen zur Vermehrung Antikörper-produzierender Zellen", Diplomarbeit, Würzburg
- Hünig, T., Schimpl, A. and Wecker, E. (1974) "Autoradiographic Studies on the Proliferation of Antibody-producing Cells *in vitro*", *J. Exp. Med.* 139, 754 - 760
- Insel, P.A. and Fenno, J. (1978) "Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase mediates a Cyclic AMP-Stimulated Decrease in Ornithine and S-Adenosylmethionine Decarboxylase Activities", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 862 - 865
- Jänne, J. and Williams-Ashman, H.G. (1971) "On the Purification of L-Ornithine Decarboxylase from Rat Prostate and Effects of Thiol Compounds on the Enzyme", *J. Biol. Chem.* 246, 1725 - 1732

- Janossy, G. and Greaves, M.F. (1971) "Lymphocyte Activation. I. Response of T and B Lymphocytes to Phytomitogens", *Clin. Exptl. Immunol.* 2, 483 - 498
- Janossy, G., Shohat, M., Greaves, M.F. and Dourmashkin, R.R. (1972) Lymphocyte Activation. IV. The Ultrastructural Pattern of the Response of Mouse T and B Cells to Mitogenic Stimulus *in vitro*", *Immunology* 24, 211 - 227
- Janossy, G., Greaves, M.F., Doenhoff, M.J. and Snajdr, J. (1973) "Lymphocyte Activation. V. Quantitation of the Proliferative Responses to Mitogens Using Defined T and B Cell Populations", *Clin. Exptl. Immunol.* 14, 581 - 596
- Janossy, G., Snajdr, J. and Simak-Ellis, M. (1976) "Patterns of B-Lymphocyte Gene Expression Elicited by Lipopolysaccharide Mitogen", *Immunology* 30, 799 - 810
- Jasińska, J., Steffen, J.A. and Michalowski, A. (1970) "Studies on *in vitro* Lymphocyte Proliferation in Cultures Synchronized by the Inhibition of DNA Synthesis", *Exp. Cell Res.* 61, 333 - 341
- Jazwinski, S.M., Wang, J.L. and Edelman, G.M. (1976) "Initiation of Replication in Chromosomal DNA induced by Extracts from Proliferating Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2231 - 2235
- Johnson, E.M., Karn, J. and Allfrey, V.G. (1974) "Early Nuclear Events in the Induction of Lymphocyte Proliferation by Mitogens. Effect of Concanavalin A on the Phosphorylation and Distribution of Non-Histone Chromatin Proteins", *J. Biol. Chem.* 249, 4990 - 4999
- Jones, G. (1973) "Lymphocyte Activation. III. The Prolonged Requirement for Mitogen in Phytohaemagglutinin- and Concanavalin A-Stimulated Cultures", *J. Immunol.* 110, 1262 - 1267
- Julius, M.H., Simpson, E. and Herzenberg, L.A. (1973) "A Rapid Method for the Isolation of Functional Thymus-Derived Murine Lymphocytes", *Eur. J. Immunol.* 3, 645 - 649
- Kay, J.E. (1968) "Early Effects of PEA on Lymphocyte RNA Synthesis", *Eur. J. Biochem.* 4, 225 - 232
- Kay, J.E., Leventhal, B.G. and Cooper, H.L. (1969) "Effects of Inhibition of Ribosomal RNA Synthesis on the Stimulation of Lymphocytes by Phytohaemagglutinin", *Exp. Cell Res.* 54, 94 - 100
- Kay, J.E. and Cooper, H.L. (1969) "Rapidly Labeled Cytoplasmic RNA in Normal and PHA-Stimulated Human Lymphocytes", *Biochim. Biophys. Acta* 186, 62 - 84

- Kay, J.E. and Cooke, A. (1971) "Ornithine Decarboxylase and Ribosomal RNA Synthesis during the Stimulation of Lymphocytes by Phytohaemagglutinin", *FEBS Lett.* 16, 9 - 12
- Kay, J.E., Ahern, T. and Atkins, M. (1971) "Control of Protein Synthesis during the Activation of Lymphocytes by Phytohaemagglutinin", *Biochim. Biophys. Acta* 247, 322 - 334
- Kay, J.E. and Lindsay, V.J. (1973) "Polyamine Synthesis during Lymphocyte Activation. Induction of Ornithine Decarboxylase and S-Adenosylmethionine Decarboxylase", *Exp. Cell Res.* 77, 428 - 436
- Kay, J.E. and Pegg, A.E. (1973) "Effect of Inhibition of Spermidine Formation on Protein and Nucleic Acid Synthesis during Lymphocyte Activation", *FEBS Lett.* 29, 301 - 304
- Kletzien, R.F., Miller, M.R. and Pardee, A.B. (1977) "Unique Cytoplasmic Phosphoproteins are Associated with Cell Growth Arrest", *Nature* 270, 57 - 59
- Knight, S.C., Ling, N.R., Sell, S. and Oxnard, K. (1965) "The Transformation of the Lymphocytes of some Laboratory Animals", *Immunology* 9, 565 - 574
- Knutson, J.C. and Morris, D.R. (1978) "Cellular Polyamine Depletion reduces DNA Synthesis in Isolated Lymphocyte Nuclei", *Biochem. Biophys. Acta* 520, 291 - 301
- Krokan, H. and Eriksen, A. (1977) "DNA Synthesis in HeLa Cells and Isolated Nuclei after Treatment with an Inhibitor of Spermin Synthesis Methyl-Glyoxal-Bis-(Guanylhydrazone)", *Eur. J. Biochem.* 72, 501 - 508
- Krokan, H., Wist, E. and Prydz, H. (1977) "Effect of Cytosol on DNA Synthesis in Isolated HeLa Cell Nuclei", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 414 - 419
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4", *Nature* 227, 680 - 685
- Land, H. and Schäfer, K.P. (1977) "*In vitro* Synthesis and Stability of RNA in Isolated Nuclei from Bovine Lymphocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 947 - 957
- Lazáry, S. and Stähelin, H. (1968) "Immunosuppressive and Specific Antimitotic Effects of Ovalicin", *Experientia* 24, 1171 - 1173
- Lazáry, S. and Stähelin, H. (1969) "Immunosuppressive Effect of a New Antibiotic: Ovalicin", *Antibiotica Chemother. Basel* 15, 177 - 181

- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtke, H. (1977) "RNA Molecular Weight Determination by Gel Electrophoresis under Denaturing Condition, a Critical Reexamination", *Biochemistry* 16, 4743 - 4751
- Lembke, H. and Opitz, H.G. (1976) "Function of 2-Mercaptoethanol as a Macrophage substitute in the Primary Immune Response in vitro", *J. Immunol.* 117, 388
- Levy, R., Levy, S.A., Rosenberg, S.A. and Simpson, R.T. (1973) "Selective Stimulation of Nonhistone Chromatin Protein Synthesis in Lymphoid Cells by Phytohaemagglutinin", *Biochemistry* 12, 224 - 228
- Lieberman, I., Abrams, R. and Ove, P. (1963) "Changes in the Metabolism of Ribonucleic Acid Preceding the Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Mammalian Cells Cultured from the Animal", *J. Biol. Chem.* 238, 2141 - 2149
- Liebhaber, S.A., Wolf, S. and Schlessinger, D. (1978) "Differences in rRNA Metabolism of Primary and SV 40-Transformed Human Fibroblasts", *Cell* 13, 121 - 127
- Lindell, T.J. (1976) "Evidence for an Extranucleolar Mechanism of Actinomycin D Action", *Nature* 262, 347 - 350
- Lindell, J.E., O'Malley, F. and Puglisi, B. (1978) "Inhibition of Nucleoplasmatic Transcription and the Translation of Rapidly Labeled Nuclear Proteins by Low Concentrations of Actinomycin D in vivo. Proposed Role of Messenger RNA in Ribosomal RNA Transcription", *Biochemistry* 17, 1154 - 1160
- Ling, N.R. and Kay, J.E. (1975) "Lymphocyte Stimulation", 2nd edn., North-Holland, Amsterdam
- Loeb, L.A., Ewald, J.L. and Agarwal, S.S. (1970) "DNA Polymerase and DNA Replication during Lymphocyte Transformation", *Cancer Res.* 30, 2514 - 2520
- Loening, U.E. (1967) "The Fractionation of High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis", *Biochem. J.* 102, 251 - 257
- Lohrmann, H.-P., Graw, C.M. and Graw Jr., R.G. (1974) "Stimulated Lymphocyte Cultures. Responder Recruitment and Cell Cycle Kinetics", *J. Exp. Med.* 139, 1037 - 1048
- Malkinson, A.M. and Wang, T. (1978) "Increased Phosphorylation of a Specific Protein in Mitogen-Stimulated Lymphocytes", *Exp. Cell Res.* 113, 442 - 445
- Mamont, P.S., Böhlen, P., McCann, P.P., Schuber, F. and Tardif, C. (1976) " $\alpha$ -Methyl Ornithine, a Potent Competitive Inhibitor of Ornithine Decarboxylase, Blocks Proliferation of Rat Hepatoma Cells in Culture", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1626 - 1630

- Moerman, C., Lanotte, M. and Panijel, J. (1977) "Comparative Studies of DNA Elongation in Mitogen Stimulated Mouse Thymocytes and Spleenocytes", *Exp. Cell Res.* 109, 201 - 211
- Morris, D.W. and Kjeldgaard, N.O. (1968) "Evidence for Non-Coordinate Regulation of Ribonucleic Acid Synthesis in Stringent Strains of *Escherichia coli*", *J. Mol. Biol.* 31, 145 - 148
- Mugraby, L., Gery, I. and Sulitzeanu, D. (1975) "Subpopulations of Mouse Spleen Lymphocytes. III. Cellular Interactions in the Response to Concanavalin A", *Immunology* 28, 1123 - 1133
- Muramatsu, M., Shimada, N. and Higashimakagawa, T. (1970) "Effect of Cycloheximid on the Nucleolar RNA Synthesis in Rat Liver", *J. Mol. Biol.* 52, 91 - 106
- Opitz, H.G., Lembke, H. and Hewlett, G. (1978) "Activation of T-Cells by a Macrophage or 2-Mercaptoethanol. Activated Serum Factor is Essential for Induction of a Primary Immune Response to Heterologous Red Cells *in vitro*", *Immunol. Rev.* 40, 53 - 77
- Otani, S., Mizoguchi, Y. and Morisawa, S. (1974) "Inhibition of DNA Synthesis by Methyl-Glyoxal-Bis-(Guanylhydrazone) during Lymphocyte Transformation", *Molecular Biology Reports* 1, 431 - 436
- Panijel, J., Taudou, G., Weyer, A. and Taudou, B. (1972) "On the RNA Synthesis in Nuclei from Immunized Rabbit Lymph Node Cells", *FEBS Lett.* 21, 83 - 87
- Pegg, A.E. and Williams-Ashman, H.G. (1969) "On the Role of S-Adenosyl-L-methionine in the Biosynthesis of Spermidine of Rat Prostate", *J. Biol. Chem.* 244, 682 - 693
- Pene, J.J., Knight Jr., E. and Darnell Jr., J.E. (1968) "Characterization of a New Low Molecular Weight RNA in HeLa Cell Ribosomes", *J. Mol. Biol.* 33, 609 - 623
- Perry, R.P. and Kelley, D.E. (1968) "Persistent Synthesis of 5 S RNA when Production of 28 S and 18 S Ribosomal RNA is Inhibited by Low Doses of Actinomycin D", *J. Cell. Physiol.* 72, 235 - 246
- Persson, U., Hammerström, L., Möller, G. and Smith, C.I.E. (1978) "The Role of Adherent Cells in B and T Lymphocyte Activation", *Immunol. Rev.* 40, 78 - 101
- Peters, J.H. and Hausen, P. (1971) "Effect of Phytohaemagglutinin on Lymphocyte Membrane Transport. I. Stimulation of Uridine Uptake", *Eur. J. Biochem.* 19, 502 - 508
- Pratt, H.P.M., Fitzgerald, P.A. and Saxon, A. (1977) "Synthesis of Sterol and Phospholipid Induced by the Interaction of Phytohaemagglutinin and Other Mitogens with Human Lympho-

- cytes and their Relation to Blastogenesis and DNA Synthesis", *Cell. Immunol.* 32, 160 - 170
- Raff, M.C. and Owen, J.J.T. (1971) "Thymus-Derived Lymphocytes: Their Distribution and Role in the Development of Peripheral Lymphoid Tissues of the Mouse", *Eur. J. Immunol.* 1, 27 - 30
- Resch, K. and Ferber, E. (1972) "Phospholipid Metabolism of Stimulated Lymphocytes. Effect of Phytohaemagglutinin, Concanavalin A and Anti-Immunoglobulin Serum", *Eur. J. Biochem.* 27, 153 - 161
- Resch, K. (1977) "Membrane Associated Events in Lymphocyte Activation" in "Receptors and Recognition" (Cuatrecasas, P. and Greaves, M.F., eds.), Chapman and Hall, London, pp. 59 - 117
- Richter, H. (1977) "Zum molekularen Wirkungsmechanismus des Cytostatikums Betainylanguidiniumchlorid und weiterer 12, 13-Epoxytrichothecene in Mäusemilzlymphozyten", Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Würzburg
- Robbins, J.H. and Kraemer, K.H. (1972) "Prolonged Ultraviolet-Induced Thymidin Incorporation into Xeroderma Pigmentosum Lymphocytes: Studies on its Duration, Amount, Localization and Relationship to Hydroxyurea", *Biochim. Biophys. Acta* 277, 7 - 14
- Rosenstreich, D.L. and Mizel, S.B. (1978) "The Participation of Macrophages and Macrophage Cell Lines in the Activation of T Lymphocytes by Mitogens", *Immunol. Rev.* 40, 102 - 135
- Rupniak, H.T. and Paul, D. (1978a) "Regulation of the Cell Cycle by Polyamines in Normal and Transformed Fibroblasts", *Advances in Polyamine Research* 1, 117 - 126
- Rupniak, H.T. and Paul, D. (1978b) "Inhibition of Spermidine and Spermine Synthesis Leads to Growth Arrest of Rat Embryo Fibroblasts in G<sub>1</sub>", *J. Cell. Physiol.* 94, 161 - 175
- Salzman, N.P., Pellegrino, M. and Franceschini, P. (1966) "Biochemical Changes in Phytohaemagglutinin Stimulated Human Lymphocytes", *Exp. Cell Res.* 44, 73 - 83
- Schläger, E.-J. (1978) "Chromatin Replication in Isolated Nuclei from Bovine Lymphocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 8 - 18
- Seale, R.L. and Simpson, R.T. (1975) "Effects of Cycloheximid on Chromatin Biosynthesis", *J. Mol. Biol.* 94, 497 - 501
- Seale, R.L. (1976) "Studies on the Mode of Segregation of Histone Nu Bodies during Replication in HeLa Cells", *Cell* 9, 423 - 429
- Shaaya, E. (1976) "Separation of High-Molecular-Weight Heterodisperse RNA and rRNA by Polyacrylamide Gels", *Analyt. Biochem.* 75, 325 - 328

- Shulman, R.W., Scripatti, C.E. and Warner, J.R. (1977) "Noncoordinated Transcription in the Absence of Protein Synthesis in Yeast", *J. Biol. Chem.* 252, 1344 - 1349
- Sigg, H.P. and Weber, H.P. (1968) "Isolierung und Strukturaufklärung von Ovalicin", *Helv. Chim. Acta* 51, 1395 - 1408
- Sören, L. (1973) "Variability of the Time at which PHA-Stimulated Lymphocytes Initiate DNA Synthesis", *Exp. Cell Res.* 78, 201 - 208
- Sören, L. and Bieberfeld, P. (1973) "Quantitative Studies on RNA Accumulation in Human PHA-Stimulated Lymphocytes during Blast Transformation", *Exp. Cell Res.* 79, 359 - 367
- Spirin, A.S. (1963) "Some Problems Concerning the Macromolecular Structure of Ribonucleic Acid", *Progr. Nuc. Acid. Res.* 1, 301 - 345
- Steffen, J.A. and Stolzmann, W.M. (1969) "Studies on *in vitro* Lymphocyte Proliferation in Cultures Synchronized by the Inhibition of DNA Synthesis. I. Variability of S + G<sub>2</sub> Periods of First Generation Cells", *Exp. Cell Res.* 56, 455<sup>2</sup> - 460
- Stephens, L., Artz, S.W. and Bruce, N.A. (1975) "Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): Positive Effector for Histidine Operon Transcription and General Signal for Amino-Acid Deficiency", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4389 - 4393
- Stobo, J.D. (1972) "Phytohaemagglutinin and Concanavalin A: Probes for Murine T Cell Activation and Differentiation", *Transplant. Rev.* 11, 60 - 86
- Stott, D.I. and Williamson, A.R. (1978) "Non-Histone Chromatin Proteins of B Lymphocytes Stimulated by Lipopolysaccharide: I. Synthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 521, 726 - 738
- Tarbell, D.S., Carman, A.M., Chapman, D.D., Cremer, S.E., Cross, A.D., Huffman, K.R., Kunstmann, M., McCorkindale, N.J., McNally Jr., J.G., Sosowsky, A., Varino, F.H.L. and West, R.L. (1961) "The Chemistry of Fumagillin", *J. Am. Chem. Soc.* 83, 3096 - 3113
- Tarbor, C.W. and Tarbor, H. (1976) "1,4-Diaminobutane (Putrescine), Spermidine and Spermin", *Ann. Rev. Biochem.* 45, 285 - 306
- Thompson, L.R. and Mueller, G.C. (1975) "DNA Replication in Nuclei from Bovine Lymphocytes", *Biochim. Biophys. Acta* 378, 344 - 353
- Trowell, O.A. (1958) "The Lymphocyte", *Int. Rev. Cytol.* 7, 235 - 286
- Tseng, B.Y. and Goulian, M. (1975) "DNA Synthesis in Human Lymphocytes: Intermediates in DNA Synthesis, *in vitro* and *in vivo*", *J. Mol. Biol.* 99, 317 - 337

- Unanue, E.R. (1978) "The Regulation of Lymphocyte Functions by the Macrophage", *Immunol. Rev.* 40, 227 - 255
- Usher, D.C. and Reiter, H. (1977) "Catabolism of Thymidine during the Lymphocyte Cell Cycle", *Cell* 12, 365 - 370
- Venkatesan, N. (1977) "Mechanism of Inhibition of DNA Synthesis by Cycloheximid in Balb/3T3 Cells", *Biochim. Biophys. Acta* 478, 437 - 453
- Waite, W.J., Hathaway, P. and Hirschhorn, K. (1971) "Protein Synthesis in Stimulated Lymphocytes. I. Conditions and Results of an Assay System", *Clin. Exp. Immunol.* 9, 903 - 913
- Wang, J.L., Gunther, G.R. and Edelman, G.M. (1975) "Inhibition by Colchicine of the Mitogenic Stimulation of Lymphocytes prior to the S-Phase", *J. Cell Biol.* 66, 128 - 144
- Warburg, O. and Christian, W. (1941) "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase", *Bio. Z.* 310, 384 - 421
- Warner, J.R. and Gorenstein, C. (1978) "Yeast Has a True Stringent response", *Nature* 275, 338 - 339
- Ways, P. and Hanahan, D.J. (1964) "Characterization and Quantification of Red Cell Lipids in Normal Man", *J. Lipid Res.* 5, 318 - 328
- Wehrli, W., Handschin, I. and Wunderli, W. (1976) "Interaction between Rifampicin and DNA-Dependant RNA Polymerase of *Escherichia coli*" in "RNA Polymerase" (Losick, R. and Chamberlin, M.J., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 397 - 412
- Weiner, E. (1976) "Über die immunsuppressive Wirkung des Sesquiterpens Ovalicin auf Lymphozyten", Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Würzburg
- Weintraub, H. (1976) "Cooperative Alignment of Nu Bodies during Chromosome Replication in the Presence of Cycloheximid", *Cell*, 9, 419 - 422
- Wettenhall, R.E.H. and London, D.R. (1974) "Evidence for Translational Control of 'Early' Protein Synthesis in Lymphocytes stimulated with Concanavalin A", *Biochim. Biophys. Acta* 349, 214 - 225
- Williams-Ashman, H.G. and Schenone, A. (1972) "Methyl-Glyoxoxal Bis-(Guanylhydrazone) as a Potent Inhibitor of Mammalian and Yeast S-Adenosyl Methionine Decarboxylase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 288 - 295
- Wolf, S.F. and Schlessinger, D. (1977) "Nuclear Metabolism of Ribosomal RNA in Growing, Methionine-Limited and Ethionine-Treated FeLa-Cells", *Biochemistry* 16, 2783 - 2791

### Zusammenfassung

Der sesquiterpenoide Pilzmetabolit Ovalicin ist ein äußerst wirksamer Inhibitor lymphoider Zellen. Halbmaximale Hemmung der DNA-Synthese proliferierender Milzzellen und Lymphomzellen aus Mäusen beobachtet man bei Konzentrationen von  $6 \cdot 10^{-10}$  Mol/l.

Andere eukariotische Zellen (z.B. HeLa- und 3T6-Zellen) werden in ihrem Wachstum nur wenig beeinflusst, da sich die Wirkung von Ovalicin bei ihnen sehr langsam ausprägt.

Folgende Beobachtungen stützen die Vermutung, daß die DNA-Synthese nur indirekt gehemmt wird:

- (i) Die DNA-Synthese in einem zellfreien System wird durch Ovalicin nicht reduziert
- (ii) Kerne aus Ovalicin behandelten Lymphozyten zeigen eine verminderte DNA-Syntheseaktivität
- (iii) In Zellkultur wirkt Ovalicin nicht sofort auf die DNA-Synthese, wenn es während der S-Phase zugesetzt wird und für maximale Hemmung wird eine Einwirkungsdauer des Toxins von 12 - 24 Stunden benötigt

Auf der anderen Seite werden Reaktionen, die charakteristisch für frühe Zellzyklusphasen sind, nicht gehemmt oder nur schwach reduziert, wie z.B. die Stimulation des Plasmamembranlipidstoffwechsels kurz nach Mitogenzugabe oder die Transformation des kleinen Lymphozyten zur großen Blastzelle.

Im Gegensatz zur DNA-Synthese wird die Proteinsynthese - 12 Stunden nach Mitogenzugabe gemessen - nur schwach beeinflusst. Hemmung der DNA-Synthese scheint daher nicht durch direkte Ausschaltung der Ribosomenfunktion verursacht zu sein, wie dies von klassischen Hemmstoffen der Protein-Synthese bekannt ist. Bestätigt wird diese Vermutung durch die Unwirksamkeit von Ovalicin in einem zellfreien Proteinsynthesystem mit Ribosomen aus Lymphozyten. Nach einer 36 stündigen Inkubation mit Ovalicin nimmt die Proteinsyntheseaktivität weiter ab und die Reduktion der Proteinsynthese erreicht fast die Größe der DNA-Synthesehemmung. Die Zunahme der Protein-

synthesehemmung wird nicht durch die unterbundene DNA-Biosynthese verursacht, da die Bildung der Histone durch Ovalicin nicht selektiv verhindert ist.

Ein früher Effekt des Toxins ist die Reduktion der RNA-Synthese. Bevorzugt wird die Synthese der ribosomalen RNA-Spezies reduziert. Dies führt zu einer Verminderung der Neusynthese von Ribosomen.

Ovalicin scheint allerdings die Synthese der ribosomalen RNA nicht direkt zu hemmen, wie Untersuchungen in einem zellfreien System ergeben haben.

Der zeitliche Verlauf der Hemmung von DNA- und Proteinsynthese als Folge der Reduktion des Proteinsyntheseapparats wird diskutiert.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSS	'balanced salt solution'
BSS/Thymidin	'balanced salt solution' mit 0.1 mg Thymidin/ml
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Dexoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglycol-bis-( -aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure
IpM	Impulse pro Minute
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration für halbmaximale Enzymsättigung)
M	molar
ME	2-Mercaptoäthanol
MEM	'minimal essential medium'
min	Minute
mRNA	'messenger'RNA
P <sub>1</sub> - P <sub>4</sub>	Puffer für Kernisolierung (s. Methode 13aa)
PBS	'phosphate buffered saline'
PBS-d	'phosphate buffered saline' ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg-Konstante
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	'transfer'RNA

UDP	Uridin-5'-diphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat

Lebenslauf

Name: Wolfgang Alois Zimmermann  
Geburtsdatum: 9. 2. 1950  
Geburtsort: Würzburg  
Eltern: Franz Zimmermann, Bundesbahnsekretär  
Katharina Zimmermann, geb. Förtsch

1956 - 1960 Volksschule Kitzingen  
1960 - 1969 Armin-Knab-Gymnasium (mathematisch-  
naturwissenschaftlicher Zweig),  
Kitzingen

1969 Abitur  
1969 - 1975 Studium der Chemie an der Univer-  
sität Würzburg

April 1972 Diplom- Vorprüfung  
Juli 1974 Diplom-Hauptprüfung  
August 1974 - Juli 1975 Diplomarbeit unter Anleitung von  
Prof. E. Schweizer am Institut für  
Biochemie der Universität Würzburg

September 1975 - Juli 1979 Doktorarbeit unter Anleitung von  
Prof. G. Hartmann am Institut für  
Biochemie der Universität München

Ich bin verheiratet und habe einen Sohn.