

## IMMUNOLOGISCHE SEQUENZ UND NUCLEINSÄURE-STOFFWECHSEL IN GEGENWART VON ENDOXAN (CYCLOPHOSPHAMID)\*

G. BRANDNER und H. KRÖGER

Biochemisches Institut der Universität Freiburg im Breisgau, Deutschland

(Received 24 July 1967; accepted 28 July 1967)

**Abstract**—Endoxan, given to rabbits during the primary response with alcohol-dehydrogenase as antigen, suppresses the synthesis of IgG-type antibodies. On the other hand the synthesis of IgM-antibodies is prolonged. In parallel experiments in the nucleic acid metabolism of the spleen, the DNA synthesis was found to be considerably higher after the injection of the antigen. The RNA metabolism was not affected. In the presence of Endoxan no stimulation of DNA synthesis could be observed. The relationship between DNA synthesis and the sequence of the immunological response is discussed.

DIE SYNTHESE von Antikörpern läuft in zwei Phasen, der sogenannten immunologischen Sequenz, ab: in der ersten werden die schwereren IgM-Antikörper gebildet, die in der zweiten von den leichteren IgG-Antikörpern abgelöst werden.<sup>1-4</sup> Eine ganze Reihe von Stoffwechsel-Antagonisten sind in der Lage, die Synthese von Antikörpern zu hemmen.<sup>5</sup> So vermögen unter anderem 6-Mercaptopurin<sup>6</sup> und Endoxan<sup>7, 8</sup> den Aufbau von Antikörpern einzuschränken. Beim Studium der immunologischen Sequenz beobachteten Sahiar und Schwartz,<sup>9</sup> dass 6-Mercaptopurin die Phase der IgM-Antikörper verlängert. Der gleiche Effekt wurde auch bei der Applikation von Methotrexat beobachtet.<sup>10</sup>

In dieser Arbeit wird über den Einfluss von Endoxan auf die immunologische Sequenz der Antikörperbildung gegen Alkohol-Dehydrogenase berichtet. Weiterhin beschreiben wir den Einfluss dieser Substanzen auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel von Milzzellen.

### METHODEN

#### 1. Immunisierung

Kaninchen im Gewicht von 1,8-2,5 kg erhielten zur Erstimmunisierung  $1 \times 8$  mg ADH intravenös. Zur Zweitimmunisierung gaben wir 0,4 mg ADH; diese Tiere hatten 6-8 Monate vorher im Abstand von 2 Tagen 2; 2,5; 3; 3,5; 4 und 5 mg ADH erhalten.

#### 2. Antikörperbestimmung

(a) *Gesamt-Titer*. Diesen ermittelten wir im optischen Test als Hemmung der ADH-Enzymaktivität durch Antiserum. In einer Kuvette ( $d = 1$  cm) inkubierten wir  $100 \mu\text{l}$  Antiserum von erstimmunisierten, bzw.  $20 \mu\text{l}$  von zweitimmunisierten Kaninchen

\* *N,N-bis-(2-chloräthyl)-N'-O-propylenphosphorsäureesterdiamid*.

Abkürzungen: ADH = Alkohol-Dehydrogenase; DNA = Desoxyribonucleinsäure; 6-MP = 6-Mercaptopurin; RNA = Ribonucleinsäure.

3 Min. bei Raumtemperatur. Die ADH-Lösung war so eingestellt, dass die Extinktion (bei 366 nm) in 7 Min. um  $\Delta E = 0,250$  zunahm. Danach wurde nach dem von Kröger und Werchau<sup>11</sup> beschriebenen Verfahren weitergearbeitet.

(b) *IgG- und IgM-Antikörper: Gelfiltration.* Wir trennten die Proteine der Antiseren an Säulen (42 cm  $\times$  2,4 cm ø) von Sephadex G-200 nach dem Molekulargewicht auf. Als Elutionsmittel verwendeten wir Tris-HCl-Puffer (0,1 M; pH 8,0) mit NaCl (1,0 M) und fingen Fraktionen von 3 ml auf. Den Proteingehalt der Serumfraktionen bestimmten wir durch Messung der Extinktion bei 280 nm. Den Verlauf des Antikörpertiters erhielten wir wie oben im optischen Test. Wir setzten 0,5–1,5 ml der Fraktionen ein. Die ADH-Lösung war in diesem Falle auf eine Zunahme der Extinktion von  $\Delta E = 0,100$  in 7 Min. eingestellt.

In der graphischen Darstellung zeigt der Verlauf der ADH-Hemmung zwei Maxima, die den IgM- und IgG-Antikörpern entsprechen. Dieses konnte mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge bestätigt werden\*. Das Verhältnis der eingeschlossenen Flächeninhalte gibt den Anteil der IgM- bzw. IgG-Antikörper am Gesamttiter an.

*Zentrifugation im Saccharose-Gradienten.* Wir benutzten dazu das von Sahiar und Schwartz<sup>9</sup> beschriebene Verfahren.

### 3. Nucleinsäure-Synthese

(a) *Inkubation.* Die frisch entnommenen Milzen wurden mit der Schere zerkleinert und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm gedrückt (Prüfsieb Nr. 1 DIN 4188, Siebtechnik GmbH, Mülheim/Ruhr). Das Homogenat wurde suspendiert in Eagle's Medium, das Kaninchenserum enthielt, und in Erlenmeyer-Kolben mit Gaszufuhr und Ableitung im Wasserbad geschüttelt. Weiteres siehe in den Legenden.

(b) *RNA-Isolierung.* Die Zellen wurden nach Abkühlen des Inkubationsansatzes im Eisbad dreimal mit eiskalter 0,14 M NaCl-Lösung gewaschen. Anschliessend homogenisierten wir das Sediment in 4 ml 0,14 M NaCl und 4 ml 75-%igem Phenol (pH 6) mit einem Glashomogenisator nach Potter und Elvehjem in einem Eisbad. Danach rührten wir noch 30 Min. bei 0°. Durch Zentrifugation bei 5000 UpM (15 Min. bei 4°) trennten wir die Phasen. Aus der wässrigen fällten wir die RNA nach Zugabe von 0,5 ml 10-%iger NaCl-Lösung und 10 ml Aethanol (96%) bei -20° über Nacht aus. Diese ausgefällte RNA wurde als 0°-RNA bezeichnet. Phenol- und Interphase wurden mit weiteren 4 ml 0,15 M NaCl erneut homogenisiert, 30 Min. im Wasserbad bei 65° gerührt und durch Zentrifugation wieder getrennt. Aus der wässrigen Phase fällten wir die RNA wie oben beschrieben aus; sie wurde als 65°-RNA bezeichnet.

Die Sedimente wurden viermal mit Äthanol/Äther (1:1) gewaschen und danach mit 1 ml 0,3 N KOH 18 h bei 30° hydrolysiert. Dann säuersten wir mit HClO<sub>4</sub> auf pH 1–2, beliessen den Ansatz 1 Std. bei 0° und zentrifugierten. Der Überstand wurde mit KOH neutralisiert und nach 30 Min. stehen bei 0° zentrifugiert. In aliquoten Teilen dieses Überstandes bestimmten wir die Tritiumaktivität in Dioxan-haltigem Scintillator im Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer (Tri-Carb, Packard) und die Ribose colorimetrisch mit Orcin nach Meybaum.<sup>12</sup> Als Standard diente uns HeferNA.

\* Wir danken Herrn Doz. Dr. Dr. U. Hagen, Kernforschungszentrum Karlsruhe, für die Bestimmung der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge.

(c) *DNA-Isolierung.* Die Zellen wurden wie unter 3b gewonnen und danach die DNA nach Colter isoliert.<sup>13</sup> Die ausgefällte und mit 80 %-igem Äthanol gewaschene DNA wurde 18 Std. bei 30° mit 0,3 N KOH behandelt. Nach dem Zentrifugieren fällten wir sie aus dem Überstand mit HCl und Trichloressigsäure (5 %-ig) aus. Sie wurde nach 30 Min. Stehen bei 0° abzentrifugiert, viermal mit eiskalter Trichloressigsäure (5 %-ig) gewaschen und in weiteren 2 ml Trichloressigsäure im siedenden Wasserbad 15 Min. hydrolysiert. Die Tritiumaktivität bestimmten wir wie oben beschrieben, die Desoxyribose colorimetrisch mit Diphenylamin nach Dische.<sup>14</sup> Als Standard verwendeten wir DNA aus Heringssperma.

#### 4. Präparate

Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe bezogen wir von C. F. Boehringer und Söhne (Mannheim), und Eagle's Medium von Grand Island Biological Co. (Grand Island, New York). Sephadex G-200 lieferte die Deutsche Pharmacia GmbH (Frankfurt). Uridin-(5-T) (18 Ci/mMol) und Thymidin-(6-T) (16,5 Ci/mMol) erhielten wir von The Radiochemical Centre (Amersham, England). Endoxan verdanken wir den ASTA-Werken (Brackwede) und Penicillin G (Na-Salz) der Penicillin-Gesellschaft (Göttingen).

## ERGEBNISSE

### 1. Synthese von Antikörpern

(a) *Erstimmunisierung.* Nach der Erstimmunisierung von Kaninchen mit ADH ( $1 \times 8$  mg) stellten wir bei allen Tieren eine Synthese von Antikörpern gegen dieses Enzym fest (siehe Abb. 1a). Der Titer erreichte nach 2–3 Wochen ein Maximum mit einer Hemmung von 50–80 % im ADH-Test. Endoxan, gegeben zur Zeit der Immunisierung in der Dosis von  $3 \times 25$  mg/kg, schränkte bei 4 Tieren die Synthese von Antikörpern gegen ADH stark ein, bei den anderen kam es zu einer deutlichen Verzögerung (siehe Abb. 1b). Nach Injektion von  $3 \times 38$  mg Endoxan/kg beobachteten wir einen noch etwas stärkeren Effekt auf die Bildung der Antikörper (siehe Abb. 1c).

(b) *Zweitimmunisierung.* Wird Kaninchen, die 6–8 Monate vorher mit insgesamt 20 mg ADH immunisiert worden waren, erneut ADH gegeben ( $1 \times 0,4$  mg), so beträgt der Antikörper-Titer das 4-bis 7-fache gegenüber der Erstimmunisierung (siehe Abb. 2a). Diese Sekundärreaktion wird durch Gabe von  $3 \times 25$  mg Endoxan/kg nicht beeinflusst (siehe Abb. 2b).

### 2. Immunologische Sequenz

(a) *Erstimmunisierung.* Die Verteilung der IgG- und IgM-Antikörper am Gesamttiter haben wir während der Erstimmunisierung über 20 Tage verfolgt. Wir setzten dazu sowohl die Gelfiltration als auch die Gradienten-Zentrifugation ein. Der Anteil der IgM-Antikörper geht von durchschnittlich 55 % am 6.–7. Tag nach der Immunisierung über 35 % am 12.–13. auf 25 % am 18.–20. Tag zurück (siehe Abb. 3 und 4).

Danach untersuchten wir den Einfluss von Endoxan auf die immunologische Sequenz. Wir analysierten das Serum von Tieren, bei denen durch  $3 \times 25$  mg Endoxan/kg eine Hemmung der Antikörper-Synthese erzielt worden war. Wir stellten fest, dass der Anteil der IgM-Antikörper am Gesamttiter 2 Wochen nach der Immunisierung

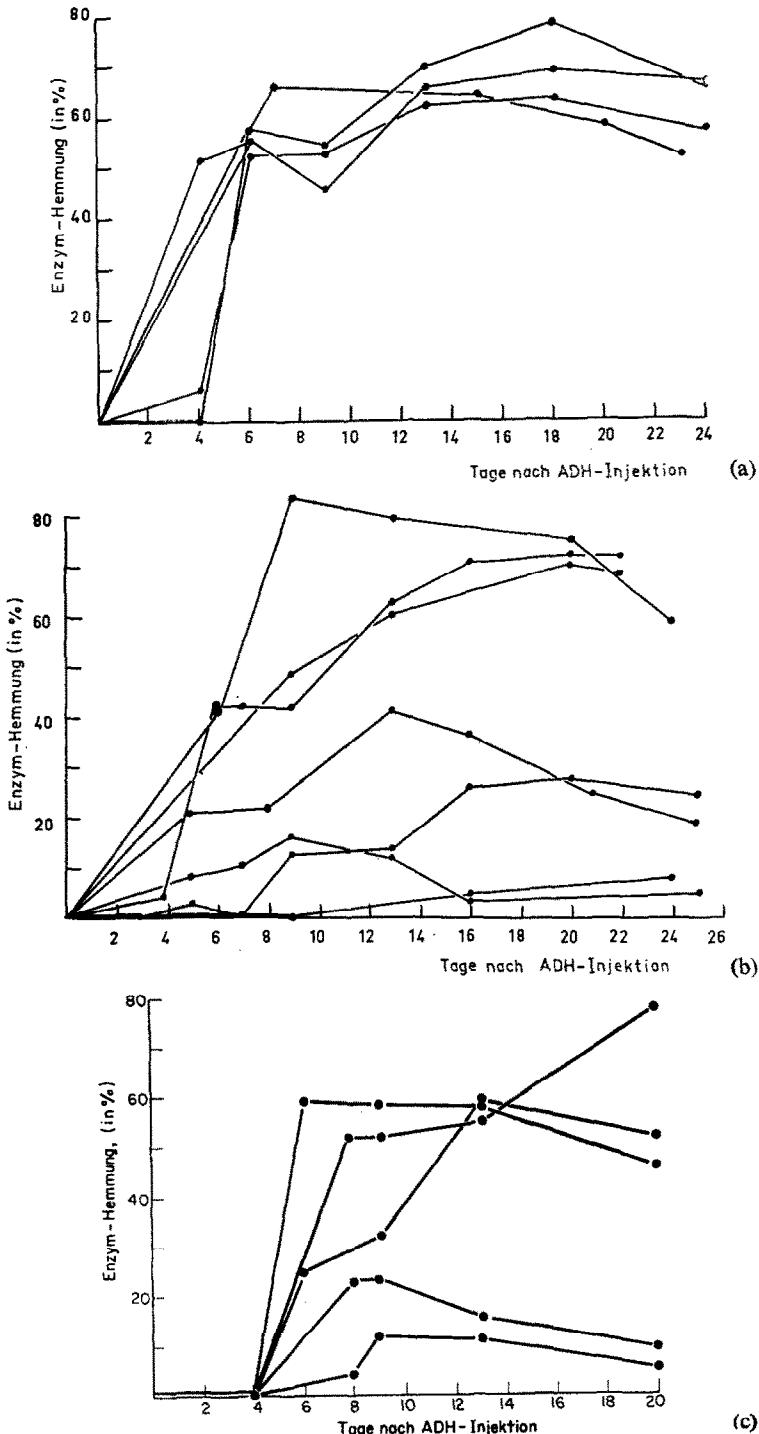


ABB. 1. Synthese von Antikörpern gegen ADH während der Erstimmunisierung. (a)  $1 \times 8$  mg ADH; (b)  $1 \times 8$  mg ADH + je 25 mg Endoxan/kg einen Tag vor ADH, gleichzeitig und einen Tag danach; (c)  $1 \times 8$  mg ADH + je 38 mg Endoxan/kg einen Tag vor ADH, gleichzeitig und einen Tag danach. Jede Kurve gibt das Verhalten von einem Kaninchen an.

nicht zurückgeht, sondern fast unverändert hoch bis zum 20. Tag bleibt (siehe Abb. 5 und 6). Das gleiche Bild erhielten wir bei Immunrepression durch  $3 \times 38$  mg Endoxan/kg.

(b) *Zweitimmunisierung*. Bei der Zweitimmunisierung von Kaninchen mit ADH überwiegen die IgG-Antikörper bereits am 6.–7. Tag bei weitem (siehe Abb. 7).

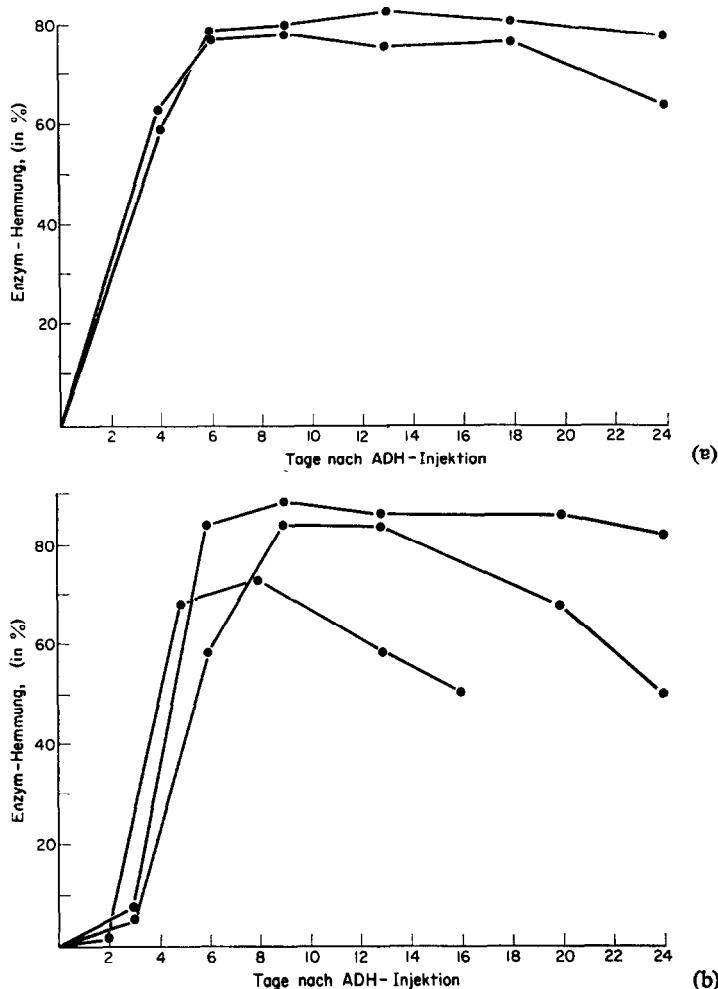


ABB. 2. Synthese von Antikörpern gegen ADH während der Zweitimmunisierung. (a)  $1 \times 0,4$  mg ADH; (b)  $1 \times 0,4$  mg ADH + je 25 mg Endoxan/kg einen Tag vor ADH, gleichzeitig und einen Tag danach. Jede Kurve gibt das Verhalten von einem Kaninchen an.

Den Verlauf unter Endoxan-Behandlung haben wir nicht untersucht, da wir bei den von uns verwendeten Dosen keine Immunrepression feststellen konnten (vgl. Abb. 2b).

### 3. Nucleinsäure-Synthese

(a) *Abhängigkeit von der Zeit*. Wir haben zunächst die Abhängigkeit der Nucleinsäure-Synthese von der Zeit geprüft, um den günstigsten Punkt für das Studium der

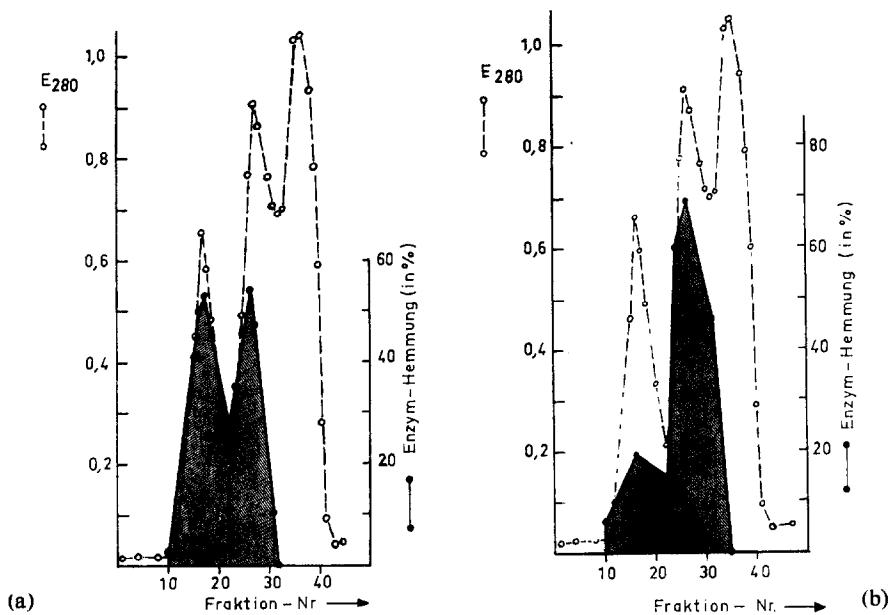


ABB. 3. Synthese von IgM- und IgG-Antikörpern während der Erstimmunisierung

Entnahme des Serums: (a) 6. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH; (b) 18. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH. Auf trennung mit Hilfe von Sephadex G-200.

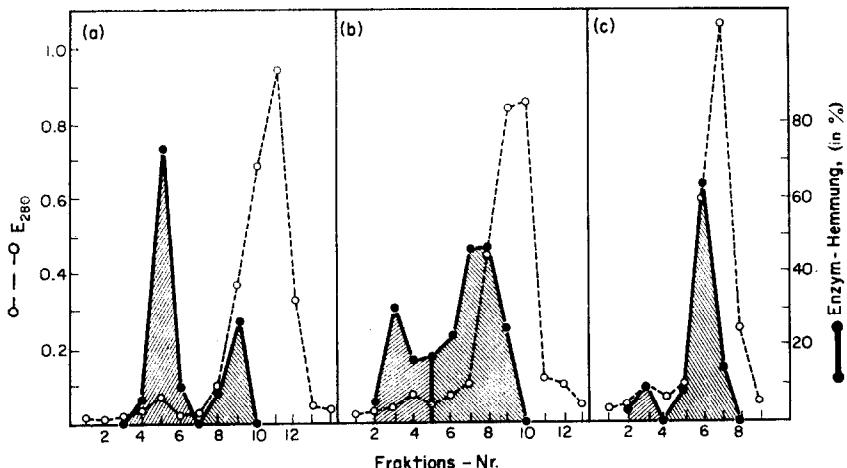


ABB. 4. Synthese von IgM- und IgG-Antikörpern während der Erstimmunisierung

Entnahme des Serums: (a) 6. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH; (b) 13. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH; (c) 18. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH. Auf trennung durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten.

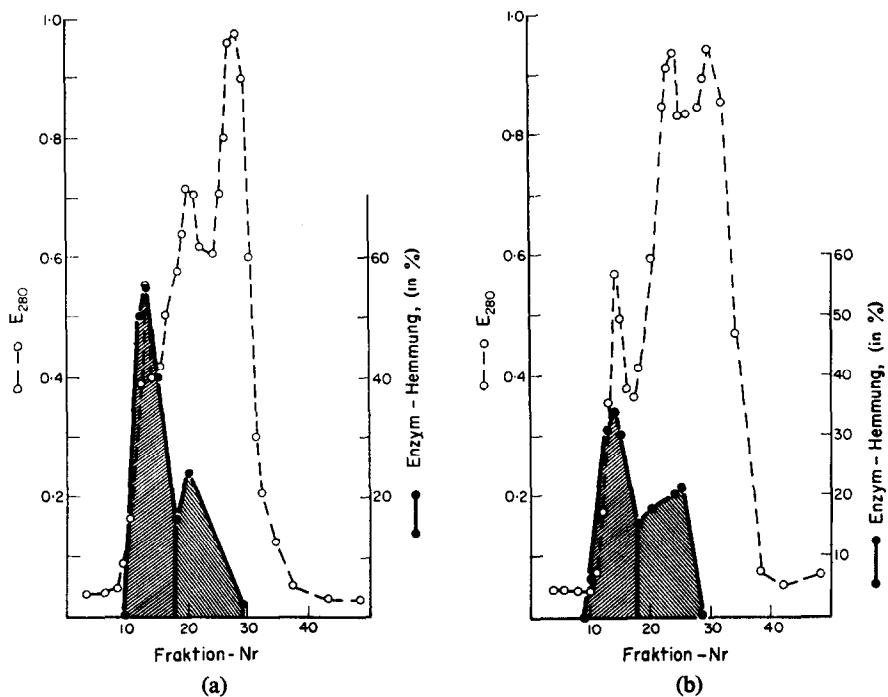


ABB. 5. Einfluss von Endoxan auf die Synthese von IgM- und IgG-Antikörpern während der Erstimmunisierung

Entnahme des Serums: (a) 7. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH und Endoxan; (b) 13. Tag nach Injektion von  $1 \times 8$  mg ADH und Endoxan. Injektion von 25 mg Endoxan/kg einen Tag vor ADH, gleichzeitig und einen Tag danach. Weiteres siehe Abb. 3.

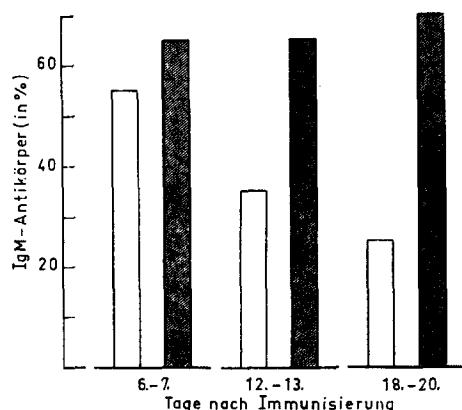


ABB. 6. Anteil der IgM-Antikörper am Gesamttiter im Verlauf der Erstimmunisierung mit ADH.

■ 1 x 8 mg ADH (Mittel aus 4 Versuchen).

▨ 1 x 8 mg ADH + je 25 mg Endoxan/kg einen Tag vor ADH, gleichzeitig und einen Tag danach (Mittel aus 3 Versuchen).

Endoxan-Wirkung herauszufinden. Aus Abb. 8 und 9 geht hervor, dass der Einbau von Thymidin-( $^3$ H) in DNA bzw. von Uridin-( $^3$ H) in RNA ans Milzhomogenaten ungefähr proportional mit der Zeit zunimmt.

(b) *DNA-Synthese*. Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass die DNA-Synthese der Milz nach Injektion ans  $1 \times 8$  mg ADH beträchtlich gesteigert ist. Der Thymidin-( $^3$ H)-Einbau in die DNA ans Milzhomogenaten ist 12 Stunden nach der Immunisierung

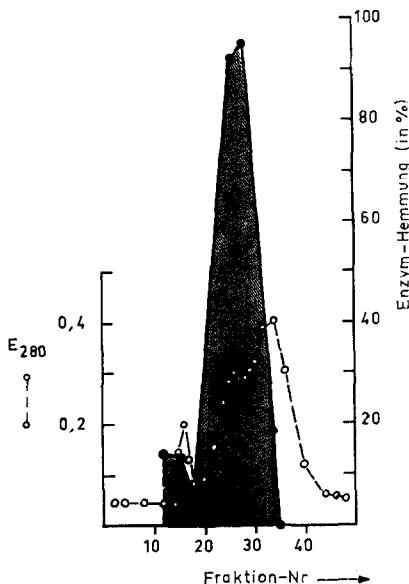


ABB. 7. Synthese von IgM- und IgG-Antikörpern während der Zweitimmunisierung  
Entnahme des Serums am 7. Tag nach Injektion von 0,4 mg ADH. Weiteres siehe Abb. 3.

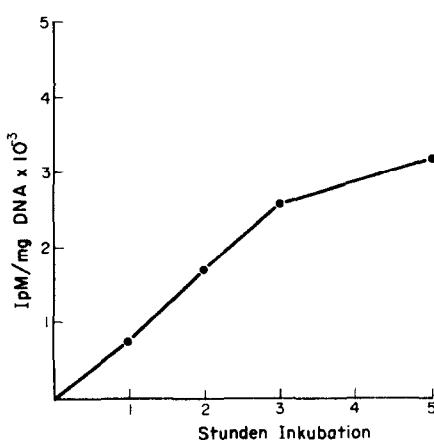


ABB. 8. Thymidin-[ $^3$ H]-Einbau in die DNA von Milzhomogenat in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer  
0,4 g Homogenat wurden in 10 ml Eagle's Medium mit 20% Kaninchenserum, 1000 I.E. Penicillin und 5  $\mu$ Ci Thymidin-[6- $^3$ H] bei 37° unter 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> geschüttelt. Die Ansätze wurden zu den angegebenen Zeiten abgestoppt und aufgearbeitet.

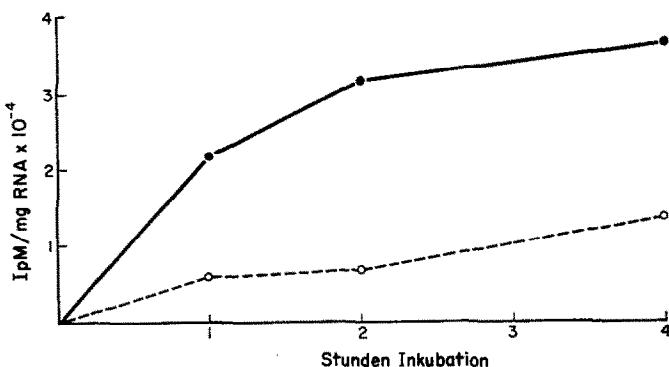


ABB. 9. Uridin-[<sup>3</sup>H]-Einbau in die RNA von Milzhomogenat in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Es wurden 5 µCi Uridin-[5-<sup>3</sup>H] eingesetzt. (Weiteres siehe Abb. 8.)

auf das 4-fache gegenüber den Kontrollen angestiegen. Verabreicht man gleichzeitig Endoxan, so wird die DNA-Synthese herabgesetzt. Dabei besteht eine deutliche Abhängigkeit von der verabreichten Endoxan-Dosis.

TABELLE 1. DNA- UND RNA-SYNTHESE IN HOMOGENATEN VON KANINCHEN-MILZ.  
IMMUNISIERUNG: 1 × 8 MG ADH 12 STD VOR DER MILZ-ENTNAHME  
ENDOXAN: 36 UND 12 STD VOR DER MILZ-ENTNAHME

|         | IpM/mg DNA bzw. RNA × 10 <sup>-3</sup> |                    |                                |                                |
|---------|--|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|         | Kontrolle                              | + ADH              | + ADH + Endoxan (2 × 38 mg/kg) | + ADH + Endoxan (2 × 25 mg/kg) |
|         |  |                    |                                |                                |
| DNA     | 5,3 ± 1,5*<br>(8)                      | 21,2 ± 4,3<br>(15) | 6,4 ± 1,8<br>(12)              | 15,5 ± 2,8<br>(11)             |
| 0°-RNA  | 11,0 ± 1,5                             | 11,4 ± 1,3         | 10,1 ± 1,8                     |                                |
| 65°-RNA | 30,1 ± 3,9<br>(9)                      | 26,5 ± 4,6<br>(6)  | 29,5 ± 6,6<br>(11)             |                                |

In 10 ml Eagle's Medium mit 20% Kaninchenserum und 1000 I.E. Penicillin wurden 0,3 bis 0,5 g Milzhomogenat sowie 5 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin bzw. 5 µCi <sup>3</sup>H-Uridin unter 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert.

Die Inkubationsdauer betrug im Falle der DNA-Synthese 2,5 Std, im Falle der RNA-Synthese 1,5 Std.

\* Angegeben als S.E.M. Zahl der Versuche in Klammern.

(c) *RNA-Synthese*. Bei der Erstimmunisierung ist die RNA-Synthese von Milzhomogenaten, gemessen am Einbau von Uridin-(<sup>3</sup>H), nicht gesteigert (siehe Tabelle 1). Durch Injektion von Endoxan (2 × 38 mg/kg) tritt in immunisierten und Kontrolltieren kein Abfall der RNA-Synthese ein.

#### DISKUSSION

Die Synthese von Antikörpern gegen ADH wird während der Erstimmunisierung durch Endoxan erheblich eingeschränkt. Bei der Analyse der immunologischen Sequenz ergab sich, dass die Produktion der IgG-Antikörper unter Einfluss von Endoxan später beginnt. Ähnliche Beobachtungen wurden kürzlich von Santos

*et al.*<sup>15</sup> gemacht, die den Einfluss von Endoxan auf die Ausbildung von Agglutininen gegen Schafserthrocyten studierten.

In Parallel-Experimenten haben wir uns dann mit dem Nucleinsäure-Stoffwechsel befasst. Es wurde deutlich, dass die DNA-Synthese im Verlaufe der Erstimmunisierung wesentlich mehr gesteigert ist als die der RNA. Ähnliche Befunde konnten wir bei *in-vivo*-Untersuchungen des Nucleinsäure-Stoffwechsels der Rattenmilz nach Injektion von Brucella-abortus-Keimen erheben.<sup>16</sup> Fernerhin stellte sich heraus, dass die DNA-Synthese empfindlicher gegen Endoxan ist als die von RNA. Von Liss und Palme<sup>17</sup> konnte dieser Effekt auch bei anderen profilierten Geweben beobachtet werden.

Aus diesen Tatsachen könnte nun abgeleitet werden, dass die Phase der IgM-Produktion weniger von DNA abhängig ist als die der IgG-Antikörper. Vielleicht werden in der ersten Phase die Zellen für die spätere Produktion von IgG-Antikörpern vorbereitet. Durch histologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IgM- und IgG-Antikörper durch verschiedene Zentren lymphoider Zellen in der Milz immunisierter Mäuse synthetisiert werden.<sup>18</sup> Die IgM-produzierenden Zellen sollen infolge ihrer geringen Proliferation eine schwache DNA-Synthese haben.<sup>19</sup>

**Anerkennung**—Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, das Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung und die Volkswagen-Stiftung.

**Zusammenfassung**—Endoxan, verabreicht während der Erstimmunisierung von Kaninchen mit Alkohol-Dehydrogenase, schränkt die Synthese von Antikörpern gegen dieses Enzym ein. Gehemmt wird vor allem die Synthese der IgG-Antikörper; die Phase der IgM-Antikörper ist erheblich verlängert.

Bei Parallel-Untersuchungen des Nucleinsäure-Stoffwechsels zeigte sich, dass die DNA-Synthese der Milz 12 Stunden nach Alkohol-Dehydrogenase-Gabe stark erhöht ist; die RNA-Synthese ist nicht verstärkt. Unter der Einwirkung von Endoxan bleibt die gesteigerte DNA-Synthese aus.

Es wird auf einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Synthese und der immunologischen Sequenz hingewiesen.

#### LITERATUR

1. P. STELOS, L. G. TALIAFERRO and P. A. D'ALE SANDRO, *J. infect. Dis.* **108**, 113 (1961).
2. D. C. BAUER and A. B. STAVITZKY, *Proc. natn Acad. Sci. U.S.A.* **47**, 1667 (1961).
3. J. LoSPALLUTO, W. MILLER, JR., B. DORWARD and C. W. FINK, *J. clin. Invest.* **41**, 1415 (1962).
4. J. W. UHR, S. FINKELSTEIN and J. B. BAUMANN, *J. exp. Med.* **115**, 655 (1962).
5. G. H. HITCHINGS and G. B. ELION, *Pharmac. Rev.* **15**, 365 (1965).
6. R. SCHWARTZ, J. STACK and W. DAMESHEK, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **99**, 164 (1958).
7. H. ST. STENDER, D. STRAUCH, H. WINTER and W. TEXTOR, *Arzneimittel-Forsch.* **13**, 1031 (1963).
8. H. ST. STENDER, *Strahlentherapie* **115**, 175 (1961).
9. K. SAHIAR and R. S. SCHWARTZ, *J. Immun.* **95**, 345 (1965).
10. R. C. BLINKOFF, *Fedn Proc.* **23**, 190 (1964).
11. H. KRÖGER and H. WERCHAU, *Zentrbl. Bakt. Parasitkd.* **194**, 122 (1964).
12. W. MEYBAUM, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **258**, 117 (1939).
13. J. S. COLTER, R. A. BROWN and K. A. O. ELLEM, *Biochim. biophys. Acta* **55**, 31 (1962).
14. Z. DISCHE, *Mikrochemie* **8**, 4 (1930).
15. C. W. SANTOS and A. H. OWENS, JR., *Nature, Lond.* **209**, 622 (1966).
16. H. KRÖGER und D. PAPANASTASIUS, im Druck.
17. E. LISS und G. PALME, *Naturwissenschaften* **50**, 336 (1963).
18. H. FRIEDMAN and J. YOUNG, *Fedn Proc.* **125**, 370 (1966).
19. W. J. K. TANNENBERG, *Fedn Proc.* **25**, 370 (1966).