

8-Methoxypsoralen macht *Agrobacterium tumefaciens*, *Kalanchoe daigremontiana* und die Tumorinduktion empfindlich für langwelliges UV

8-Methoxypsoralen Makes *Agrobacterium tumefaciens*, *Kalanchoe daigremontiana*, and the Tumor Induction Sensitive for Long Wave UV

Rolf Beiderbeck

Botanisches Institut, Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. **29 c**, 572—576 [1974] ; eingegangen am 31. Mai 1974)

Agrobacterium, Tumors, 8-Methoxypsoralen

If *Agrobacterium tumefaciens* is treated with 8-methoxypsoralen (8-MP) and irradiated with long wave UV the subsequent growth of the bacteria is stopped whereas respiration continues for at least 7 hours. Treatment with 8-MP or UV alone has no effect.

Also the wound healing processes in *Kalanchoe* leaves are inhibited by simultaneous applications of 8-MP and UV. Tumor induction on *Kalanchoe* leaves is reduced by simultaneous treatment with 8-MP and UV of a. the inducing bacteria before infection; b. the wounded leaves before infection; c. the infected leaves at least up to 24 hours after infection.

These results are discussed in relation to a participation of bacterial or host DNA in the infection process.

Experimente mit den Inhibitoren FdUrd^{1,2}, BdUrd³ und Histon⁴ deuten an, daß bei der pflanzlichen Tumorinduktion durch *Agrobacterium tumefaciens* die DNA von Wirtspflanze, Bakterium oder beiden von entscheidender Bedeutung ist. Da aber FdUrd auch auf andere Prozesse als die DNA-Synthese einwirkt⁵ und basische Proteine Membranen beeinflussen können⁶, schien es wichtig, die Beteiligung von DNA in irgendeiner Form an der Tumorinduktion mit Hilfe einer weiteren Substanz, die mit DNA interagiert, sicherzustellen. Verwendet wurde hier Xanthotoxin (= 8-Methoxypsoralen = 8-MP), ein Furocoumarin, das *in vitro* bei Bestrahlung mit langwelligem UV (320—400 nm) die DNA-Struktur verändert⁷. Die Furocoumarine besitzen photosensibilisierende Aktivität auch *in vivo*, z. B. für Viren⁸, Bakterien^{9,7,10} und Säugerzellen⁷. Bei Erbsenhülsen kann durch Behandlung mit 8-MP und UV das Enzym Phenylalanin-Ammonia-Lyase (PAL) und die Produktion von Pisatin ausgelöst werden¹¹. Letzteres gelingt auch mit Agenzien bekannter Affinität für DNA wie Mitomycin C.

Wegen dieser Wechselwirkungen des 8-MP mit DNA wurde die Substanz zur Untersuchung der Tumorinduktion verwendet. Ein Vorteil ist, daß 8-MP nur in Gegenwart von UV seine Wirkung ausübt. Damit wird es möglich, durch definierte Be-

strahlungszeiten definierte Einwirkungszeiten des 8-MP einzuhalten. Im Folgenden wird gezeigt, daß 8-MP das Wachstum der Bakterien, die Wundreaktion der Wirtspflanze und auch die Tumorinduktion beeinflußt. Damit werden die mit FdUrd, BdUrd und Histon erzielten Ergebnisse gestützt.

Material und Methoden

Anzucht der Bakterien: *A. tumefaciens*, Stamm B6 (Bopp), wurde in synthetischer Nährlösung¹² bei 22 °C unter Belüftung kultiviert, die Bakterienkonzentrationen mit Hilfe der Extinktionsmessung bei 660 nm im Spectronic 20 (Bausch & Lomb) ermittelt¹³.

Lösungen von 8-MP wurden durch mehrstündiges Rühren von 8-MP in Nährlösung hergestellt (gesättigte Lösungen). Ungelöste Kristalle wurden filtriert, die Extinktion bei 303 nm bestimmt und durch Verdünnen mit Nährlösung gewünschte Extinktionen eingestellt. Nach dem Merck-Index von 1968 entspricht einer Extinktion von 1,1 bei Raumtemperatur die Konzentration von 20 µg/ml 8-MP. Wenn nicht anders erwähnt, wurde mit dieser Konzentration gearbeitet.

Bestrahlung von 8-MP-haltigen Suspensionen oder Pflanzen erfolgte mit einer Schwarzglaslampe Osram L 20W/73 mit einer spektralen Verteilung von 310—420 nm, max. Strahldichte bei 355 nm. Die Strahlungsdosis wurde variiert durch Veränderung des Abstandes zwischen Strahlungsquelle und

bestrahltem Gut oder durch Veränderung der Bestrahlungsdosis. Als Filter für kurzwelligere Strahlungsanteile diente bei einigen Versuchen 5 mm starkes Tafelglas, das ab 315 nm gut Licht durchläßt. Nach Abschluß einer Bestrahlung wurden Bakteriensuspensionen im Dunkeln weiterkultiviert, bestrahlte Pflanzen wurden für 24–48 Stunden bei diffusem Licht (50–200 lx) aufbewahrt und anschließend unter Anzuchtbedingungen zurückgeführt.

Test auf Überleben der Bakterien erfolgte einmal durch Messung des Wachstums der Bakterienkultur, zum anderen durch Atmungsmessung mit Hilfe der Warburg-Technik bei 30 °C. Dazu wurden verdünnte Bakteriensuspensionen ($1,8 \cdot 10^8$ /ml) mit 8-MP versetzt und bestrahlt, anschließend bei 7000 rpm abzentrifugiert und als dichte Suspension in Nährlösung ($1,1$ bis $1,4 \cdot 10^9$ koloniebildende Einheiten per ml) der Atmungsmessung unterzogen. 2 ml Bakterien dienten der Atmungsmessung, 0,2 ml 20-prozentige KOH im Mitteleinsatz des Warburggefäßes dienten dem Wegfangen des gebildeten CO_2 .

Test auf Tumorbildung an *Kalanchoe daigremontiana* geschah mit dem Igel-Test¹³. Da bei Bestrahlung infizierter Pflanzen untere Blattschichten nicht erreicht werden, wurde bei einigen Experimenten mit SiC verwundet¹⁴ und anschließend infiziert. Damit wird Tumorbildung nur in den obersten Zellschichten des Blattes angeregt. Nachteile liegen bei ungleichmäßiger Verwundung und größerer Streuung der Meßwerte. Ausgewertet wurde hier 4 Wochen nach der Infektion durch Zählung der entstandenen Blatt-Tumoren unter dem Binokular.

Messung der Wundreaktion: 4 Wochen nach der Verwundung wurden Blattquerschnitte angefertigt und unter dem Mikroskop an je 5 Stellen in Schnitten aus 8 verschiedenen Blättern die Zahl der dem Wundrand parallelen Wundrandzellen festgestellt (40 Messungen pro Versuchsglied).

Ergebnisse

Bestrahlung von *Agrobacterium* in Gegenwart oder Abwesenheit von 8-MP

Werden Agrobakterien mit langwelligem UV bestrahlt, so hemmen höhere Strahlungsdosen (15 Stunden aus 25 cm) das Bakterienwachstum (Tab. I), geringere Dosen (5 min bis 1 Stunde aus 25 cm) beeinflussen das Wachstum dagegen nicht (Abb. 1). 8-MP, im Dunkeln den Bakterien zugesetzt, stört das Wachstum der Bakterien kaum (Tab. I, Abb. 1).

Tab. I. Wirkung verschiedener Dosen UV auf das Wachstum von *Agrobacterium* in Gegenwart oder Abwesenheit von 20 µg/ml 8-MP. Bestrahlung der Bakteriensuspensionen für 15 Stunden aus verschiedenen Abständen mit langwelligem UV. Angegeben Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Abstand [cm]	Behandlung	Bestrahlung	Bakterienwachstum in 15 Std. ΔE_{660}
50	ohne 8-MP	UV-bestrahlt	0,94
50	"	unbestrahlt	0,96
25	"	UV-bestrahlt	0,69
25	"	unbestrahlt	0,95
10	"	UV-bestrahlt	0,10
10	"	unbestrahlt	0,92
50	mit 8-MP	UV-bestrahlt	0,05
50	"	unbestrahlt	0,95
25	"	UV-bestrahlt	0,05
25	"	unbestrahlt	0,96
10	"	UV-bestrahlt	0,04
10	"	unbestrahlt	0,84

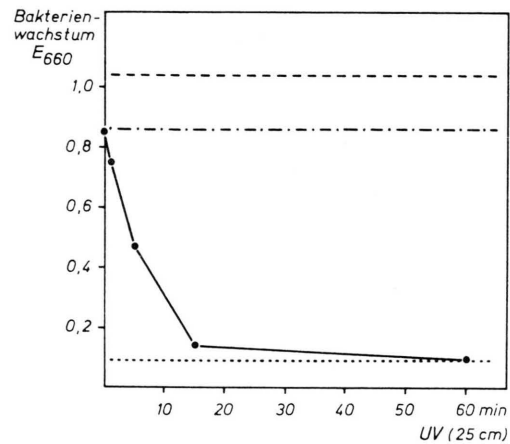


Abb. 1. Einfluß von langwelligem UV auf das Wachstum von *A. tumefaciens* in Gegenwart von 20 µg/ml 8-MP. Bestrahlt aus 25 cm Abstand für verschiedene Zeiten, danach 15 Stunden Kultur im Dunkeln bei 23 °C. — — — Kontrollbakterien ohne 8-MP mit und ohne Bestrahlung; — · — · — Kontrollbakterien mit 8-MP im Dunkeln; · · · · · Bakteriendichte zu Beginn des Versuchs; — — — — — Bakteriendichte bei Bestrahlung, in Gegenwart von 8-MP.

Kombination beider Faktoren (UV und 8-MP) bewirkt eine erhebliche Steigerung der Empfindlichkeit der Bakterien für das langwellige UV. Strahlungsdosen, die allein unwirksam sind, hemmen jetzt das bakterielle Wachstum komplett (15 min 25 cm; Abb. 1). Auch diese Hemmung ist abhängig von der Strahlungsdosis. 1 min Bestrahlung aus 25 cm (Abb. 1) ist unwirksam auch dann, wenn 15 min Vorinkubation der Bakterien mit 8-MP im Dunkeln (Erhöhung der Aufnahmezeit) vorangegangen ist. Entscheidend für die kombinierte Wir-

kung von UV und 8-MP ist, daß beide Faktoren gleichzeitig zugegen sind. Vorbestrahlung einer Lösung von 8-MP mit UV und anschließende Zugabe von Agrobakterien im Dunkeln führt nicht zur Beeinflussung des bakteriellen Wachstums. Ebenso hemmt eine Vorbehandlung der Bakterien mit UV (1 Stunde, 25 cm) das Wachstum nicht, wenn 8-MP nachträglich im Dunkeln zugefügt wird.

8-MP dringt leicht in die Bakterien ein (vgl. Abb. 1) und läßt sich leicht wieder daraus entfernen: Werden Bakterien für 30 min mit 8-MP im Dunkeln vorinkubiert, dann mit Nährlösung gewaschen, in frischer Nährlösung aufgenommen und erst anschließend mit UV bestrahlt (15 min aus 25 cm) wachsen die Bakterien genau wie unbestrahlte Kontrollen.

Hat das 8-MP seine Wirkung einmal ausgeübt, beseitigt ein Waschvorgang die Wachstumshemmung nicht mehr (Tab. II). Behandlung mit 8-MP und

Tab. II. Wirkung des Auswaschens von 8-MP aus Bakterien, die mit 8-MP (20 µg/ml) und UV (15 min aus 25 cm) vorbehandelt waren. Nach der Behandlung Waschen mit Nährlösung, aufnehmen mit Nährlösung oder Nährlösung mit 8-MP und Kultur im Dunkeln für 15 Stunden. Angegeben Mittelwerte aus 4 Experimenten.

Behandlung	Bakterienkonzentration (E_{660})
Beginn des Versuchs	0,154
unbestrahlte Bakterien	0,853
bestrahlte Bakterien, nach Waschen in Nährlösung	0,189
bestrahlte Bakterien, nach Waschen in Nährlösung + 8-MP	0,154

UV unterdrückt zwar das nachfolgende Wachstum einer Bakterienkultur, die Bakterien weisen aber noch über Stunden eine deutliche Atmung auf. Mindestens über 2 Stunden ist diese Atmungsaktivität konstant (Abb. 2), während die Zellzahl um weniger als 10% zunimmt. Unbehandelte Bakterien nehmen in 2 Stunden an Zahl um 64% zu, ihre Atmung steigt daher erheblich an (Abb. 2). 4 verschiedene Versuche führten zu gleichen Ergebnissen. Einzelmessungen 7 Stunden nach der Bestrahlung zeigen immer noch Atmung in den behandelten und unbehandelten Bakterien an, in beiden Fällen jedoch abnehmend, was methodische Gründe hat. Sicher ist, daß zumindest ein Teil der mit UV und 8-MP behandelten Bakterien auch 7 Stunden nach der Behandlung noch atmet.

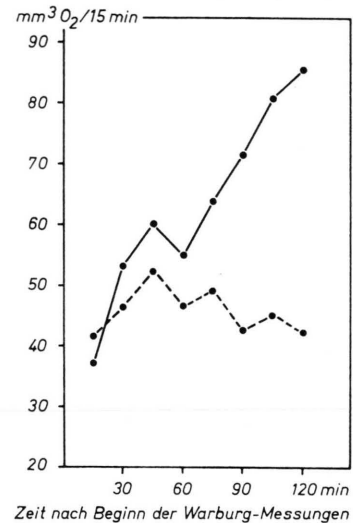


Abb. 2. Überleben der Bakterien nach Behandlung mit 8-MP (20 µg/ml) und UV (15 min aus 25 cm). Gemessen mm³ gebildeten O₂ pro 15 min in der Warburg-Apparatur. — Kontrolle ohne 8-MP und UV; --- Behandlung mit 8-MP und UV.

Bestrahlung von *Kalanchoe* in Gegenwart oder Abwesenheit von 8-MP

Bestrahlt man verwundete *Kalanchoe*-Blätter mit langwelligem UV verschiedener Dosen, so wird die Zahl der parallelen Wundteilungen, mit denen das Gewebe auf die Verwundung reagiert, nicht beeinflusst (Tab. III). Wird dagegen vor der Bestrahlung

Tab. III. Wirkung von 8-MP und langwelligem UV auf die Zahl der Wundphelloderm-Schichten an *Kalanchoe*-Blättern. Verwendet wurden 20 µg/ml 8-MP. Angegeben sind Mittelwerte aus je 3 Experimenten, in Klammern, und die Standardabweichungen.

Behandlung	Zahl der Wundschichten
Kontrolle	4,2 (0,25)
15 Std. UV, 10 cm, kein 8-MP	4,1 (0,14)
15 Std. UV, 15 cm, kein 8-MP	3,8 (0,28)
15 Std. UV, 10 cm, 8-MP	2,4 (0,35)
15 Std. UV, 15 cm, 8-MP	2,3 (0,08)
1 Std. UV, 10 cm, 8-MP	2,6 (0,28)

8-MP in die frischen Wunden gegeben, ist die Zahl der Wundteilungen etwa auf die Hälfte reduziert (Tab. III). Außerdem sind jetzt die neugebildeten Zellwände nicht parallel zur Wundfläche orientiert, sondern es ist keine klare Vorzugsrichtung der neuen Querwände zu erkennen.

Einfluß von UV und 8-MP auf die Tumorinduktion

Da eine Behandlung mit langwelligem UV und 8-MP das Wachstum von *Agrobacterium tumefaciens* hemmt und auch die Wundreaktion von *Kalanchoe* erheblich stört, ist ein Einfluß auf die Tumorinduktion zu erwarten.

Werden dünne Suspensionen von *A. tumefaciens* mit 8-MP und UV behandelt und anschließend zur Infektion verwendet, ist die Tumorbildung praktisch völlig unterdrückt (Tab. IV), wenn UV-Dosen ver-

Tab. IV. Wirkung von 8-MP und UV auf die Tumorinduktion an *Kalanchoe*. Bakterien vor der Infektion mit 20 µg/ml 8-MP behandelt und 15 min aus 25 cm bestrahlt. Igel-Test. Auswertung 3 Wochen nach der Infektion. Angegeben sind die Mittelwerte aus je 3 Experimenten.

Bakterienkonzentration [Zellen/ml]	Bestrahlung	relativer Infektionserfolg	
		Gegenwart von 8-MP	Abwesenheit von 8-MP
		[Tumoren/Wunden]	
1,8·10 ⁸	UV	0,94	0,99
"	—	0,99	0,99
1,8·10 ⁷	UV	0,55	0,95
"	—	0,95	0,96
1,8·10 ⁶	UV	0,03	0,64
"	—	0,68	0,67

wendet wurden die das Wachstum der Bakterien hemmen (vgl. Abb. 1). UV-Bestrahlung allein oder Behandlung mit 8-MP allein ändert die Fähigkeit der Bakterien, Tumoren zu induzieren, nicht (Tab. IV).

Mit steigender Bakterienkonzentration nimmt der hemmende Effekt einer gegebenen Behandlung mit UV und 8-MP ab. Dabei scheint weder 8-MP noch UV für die hohen Bakterienkonzentrationen zum Minimumfaktor zu werden: Werden Bakterien zuerst behandelt und dann verdünnt, so ist ihre Infektiosität genauso reduziert, wie wenn sie zuerst verdünnt und dann bestrahlt werden (Tab. V). Es scheint ein Teil der Bakterien die Behandlung mit unveränderter Infektiosität durchzumachen.

Tab. V. Wirkung von 8-MP (20 µg/ml) und langwelligem UV (15 min aus 25 cm) auf die Infektiosität unterschiedlicher bestrahlter Bakterienzahlen. Igeltest. Mittelwerte aus je 3 Experimenten.

Bakterienzahl [Zellen/ml]		rel. Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
bei Bestrahlung	bei Infektion	
1,8·10 ⁸	1,8·10 ⁶	0,03
1,8·10 ⁶	1,8·10 ⁶	0,03
unbestrahlt	1,8·10 ⁶	0,65

Die Tumorbildung kann auch reduziert werden, wenn infizierte *Kalanchoe*-Blätter zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion mit 8-MP und UV behandelt werden (Tab. VI). Zum Teil erfolgt diese

Tab. VI. Wirkung von 8-MP und UV auf die Tumorinduktion. *Kalanchoe*-Blätter verwundet mit SiC 120, behandelt mit 20 µg/ml 8-MP, bestrahlt mit UV zu verschiedenen Zeiten aus 10 cm Abstand. 3 Pflanzen je Versuchsglied. Angegeben sind Mittelwerte aus je 3—5 Experimenten.

Bestrahlungs- dauer [Std.]	Bakterien- konzentration [Zellen/ml]	% Tumoren in Gegenwart von 8-MP		
		Kontrolle	ohne UV	mit UV
Behandlung mit 8-MP und UV zum Zeitpunkt der Infektion				
15	$1,8 \cdot 10^5$	100	66,4	0
1	$1,8 \cdot 10^5$	100	87,6	3,9
Behandlung 24 Std. nach der Infektion				
1	$4,5 \cdot 10^5$	100	105,0	34,9
Behandlung der Blätter 24 Std. vor der Infektion				
1	$9,0 \cdot 10^5$	100	88,3	40,1

Hemmwirkung auf die Tumorinduktion über eine Hemmung des Bakterienwachstums, z. T. auch über die Pflanzenzelle selbst: Wird nämlich die Pflanze verwundet, mit 8-MP und UV behandelt und erst 24 Stunden später infiziert, ist die Tumorbildung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ebenfalls reduziert.

Diskussion

A. tumefaciens verhält sich bei Behandlung mit Furocumarinen und langwelligem UV wie andere Bakterien auch ^{7,9}. Aber auch Wachstumsprozesse des Tumorstoffes *Kalanchoe daigremontiana* können durch diese Behandlung gestört werden. Dabei wird nicht nur die Produktion einzelner Substanzen ¹¹ beeinflusst, sondern auch die Teilung der Pflanzenzellen, vermutlich über Reaktionen an der Zell-DNA. Die Möglichkeit, beide an der Tumortransformation beteiligten Partner einzeln zu beeinflussen, bedeutet natürlich auch die Möglichkeit einer Einwirkung auf die Tumorbildung selbst. Es zeigt sich, daß auch die Tumorbildung, verknüpft mit Teilung der Pflanzenzellen und vermutlich Teilung der Bakterien ¹⁵, durch kombinierte Behandlung mit 8-MP und UV gestört wird. Da zugleich bekannt ist, daß Furocumarine unter Bestrahlung mit UV die Struktur der DNA ändern, ergibt sich eine Bestätigung der in der Einleitung zitierten Experimente mit FdUrd,

BdUrd und Histon. Darüberhinaus bietet sich eine Möglichkeit der Tumorthherapie an: Aufnahme des 8-MP in Zellen im Dunkeln, lokale Bestrahlung der Tumoren, Auswaschen des 8-MP aus unbestrahlt gebliebenen Teilen des Organismus.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der DFG durchgeführt. Ihr sei herzlich gedankt. Ebenso danke ich Herrn H. Keutner für die Anzucht der Testpflanzen und Frl. R. Müller für sorgfältige Hilfe bei den Experimenten.

- ¹ M. Bopp, Z. Naturforsch. **19b**, 64 [1964].
- ² R. E. Beardsley u. J. Lipetz, J. Bacteriol. **92**, 346 [1966].
- ³ M. Bopp, Z. Naturforsch. **17b**, 282 [1962].
- ⁴ G. Fellenberg, Z. Pflanzenphysiol. **56**, 446 [1967].
- ⁵ A. H. Haber, O. J. Schwarz u. L. W. Evans, Z. Pflanzenphysiol. **67**, 287 [1972].
- ⁶ H. J.-P. Ryser u. R. Hancock, Science **150**, 501 [1965].
- ⁷ R. S. Cole, Biochim. Biophys. Acta **217**, 30 [1970].
- ⁸ L. Musajo, G. Rodighiero, G. Colombo, V. Torlone u. F. Dall'Acqua, Experientia **21**, 22 [1965].
- ⁹ W. L. Fowlks, D. G. Griffith u. E. L. Oginsky, Nature **181**, 571 [1958].
- ¹⁰ E. L. Oginsky, G. S. Green, D. G. Griffith u. W. L. Fowlks, J. Bacteriol. **78**, 831 [1959].
- ¹¹ L. A. Hadwiger, Plant Physiol. **49**, 779 [1972].
- ¹² M. Bopp, Z. Naturforsch. **20b**, 899 [1965].
- ¹³ R. Beiderbeck, Z. Naturforsch. **25b**, 407 [1970].
- ¹⁴ J. A. Lippincott u. G. T. Heberlein, Amer. J. Bot. **52**, 856 [1965].
- ¹⁵ T. Stonier, R. E. Beardsley, L. Parsons u. J. McSharry, J. Bacteriol. **91**, 266 [1966].