

OCTOPINGEHALT IN NORMAL- UND TUMORGEWEBEN EINIGER HÖHERER PFLANZEN

EDWIN HOLDERBACH und ROLF BEIDERBECK

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Deutschland

(Received 10 January 1976)

Key Word Index—Dicotyledonous plants; tumour metabolism; arginine derivatives; octopine.

Abstract—Normal and tumour tissues of different dicotyledonous species were examined for their octopine content. In all tumour tissues octopine was detected up to concentrations of 35 µg/g fr. wt. Normal tissues did not contain any octopine exceeding 20 ng/g fr. wt (limit of experimental determinations).

EINLEITUNG

Durch verschiedene Stämme des *Agrobacterium tumefaciens* induzierte Pflanzentumoren synthetisieren als Produkte eines veränderten Argininstoffwechsels Octopin [1]. Bis heute ist es jedoch umstritten, ob dieses Octopin in Normalgeweben der Pflanzen gebildet wird oder ob die Pflanzenzelle die Fähigkeit zur Octopinsynthese erst im Verlauf der Tumor-Transformation erwirbt. Vorkommen von Octopin in Normalgeweben würde gegen eine Übertragung der genetischen Information für die Octopinsynthese aus den tumorinduzierenden Bakterien in die Pflanzenzelle sprechen. Untersuchungen mit dem Ziel, dieses Problem zu klären, sind mehrfach mit unterschiedlichem Ausgang durchgeführt worden [2-5]. Eine kritische Nachuntersuchung mit verbesserter Kenntnis der methodischen Grenzen erschien daher wünschenswert. Es wurden zu diesem Zwecke Normal- und Tumorgewebe auf ihren Gehalt an Octopin geprüft.

ERGEBNISSE

(1) *Methodengenauigkeit*. Entscheidender Faktor bei Aussagen über das Vorkommen einer Substanz in Pflanzen ist die Festlegung der methodischen Grenzen: Bei Extraktion von Gewebe und anschließender Gelchromatographie, und Elektrophorese werden 74% von zugesetztem Octopin wiedergefunden. Von den 26% Verlust verbleiben 18% am Gel, der Rest geht bei den folgenden Manipulation verloren.

Die Empfindlichkeitsgrenze des Guanidin-Nachweises mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion in Lösung liegt unter den gewählten Bedingungen bei 5 µg/ml Octopin. Die Empfindlichkeitsgrenze des Nachweises von Octopin mit Hilfe der Phenanthren-Chinon-Fluoreszenz auf Cellulose-Platten ist bei 0,1 µg/ Fleck von ca. 1 cm Durchmesser erreicht. Das entspricht ca. 0,4 nMol.

(2) *Quantitative Bestimmung der Gesamtguanidine*. Die Gesamtmenge der in den Gewebeextrakten vorhandenen Guanidinderivate wie Octopin, Arginin und anderer Substanzen wurde nach Extraktion, Gelchromatographie, Lyophilisieren und Lösen mit dem Diacetylreagens bestimmt und gegen den Verlustfaktor korrigiert. Guanidine

wurden in allen untersuchten Geweben gefunden, in Tumorgeweben mehr als in Normalgeweben ($\times 2-3$).

(3) *Qualitative Bestimmung von Octopin* erfolgte stets nach der Dünnschichtelektrophorese von Extrakten und zwar auf der Cellulose-Platte mit Hilfe von Phenanthren chinon (A), in Lösung des aus den Platten eluierten Octopins mit der Diacetyl-Reaktion (B) oder nach Rechromatographie der Octopinbande der Elektrophorese an Dünnschichtplatten und Ermittlung der Fluoreszenz mit Phenanthrenchinon bzw. dessen Phosphoreszenz (C). Bei jeder untersuchten Pflanzenprobe wurden mindestens 2 der genannten Methoden A-C parallel benutzt. Eine Bande auf dem Elektropherogramm oder dem Dünnschichtchromatogramm wurde nur dann als positiv für Octopin gewertet, wenn sie (a) die gleiche chromatographische Position einnahm wie reines Octopin in Gegenwart von Pflanzenextrakt; (b) die charakteristische Fluoreszenz mit dem Phenanthrenchinon-Reagenz ergab; (c) wenn sie mit Phenanthrenchinon Phosphoreszenz ergab. Mit diesen Vorsichtsmaßnahmen konnte Octopin in allen verwendeten Tumorgeweben einwandfrei identifiziert werden. Die untersuchten Normalgewebe enthielten in keinem Falle nachweisbares Octopin (Tabl 1). Aus der Menge des extrahierten Gewebes und der Kenntnis der Nachweigrenzen läßt sich kalkulieren, daß 1 g Normalgewebe weniger als 0,02 µg

Tabelle 1. Qualitative Bestimmung von Octopin in Tumorgeweben und Normalgeweben.

Gewebe	Methoden	Vorkommen von Octopin
Normalgewebe		
<i>Helianthus annuus</i>	A/B/C	—
<i>Nicotiana tabacum</i>	A/B/C	—
<i>Datura stramonium</i>	A/B/C	—
Tumorgewebe		
<i>Helianthus annuus</i> (B6)*	A/B	+
<i>Nicotiana tabacum</i> (A6)*	A/B	+
<i>Datura stramonium</i> (A6)*	A/B/C	+
<i>Vinca rosea</i> (B6)*	A/C	+

* Bakterienstamm, der den Tumor hervorgerufen hat.

Octopin enthalten kann, wenn es überhaupt damit versehen ist.

(4) *Quantitative Bestimmung des Octopins* in Extrakten aus Tumorgeweben ergab nach Gelfiltration, präparativer Gel-elektrophorese für Tumoren von *Helianthus annuus* 26,9 µg Octopin pro g Frischgewicht (gleich 0,11 µMol) und für Tumoren aus *Datura stramonium* 35 µg Octopin pro g Frischgewicht (gleich 0,14 µMol).

DISKUSSION

In Tumor- und Normalgeweben der untersuchten Pflanzen konnten Guanidine in Mengen nachgewiesen werden, in denen sie auch in Geweben anderer Pflanzen vorkommen [3]. Auffallend ist der hohe Gehalt an Guanidinen in den Geweben von *Helianthus annuus* [3]. Octopin wurde im Rahmen der experimentellen Nachweissgrenzen, die denen anderer Untersucher ähnlich sind [2,3,5], wohl in allen Tumorgeweben, aber in keinem der Normalgewebe gefunden, obwohl als Quelle für Normalgewebe überwiegend embryonales Material diente. Wenn im Normalgewebe Octopin vorhanden ist, dann weniger als 20 ng/g Frischgewicht entspricht. In Tumorgeweben wurden bis zu 35 µg Octopin/g Frischgewicht gefunden, was mehr als dem 10³-fachen entspricht. Die Frage, ob die genetische Information für Octopinsynthese in den Tumoren letztlich den Bakterien entstammt, kann nicht endgültig geklärt werden. Mit der verwendeten Techniken läßt sich aber kein Indiz dafür finden, daß normale Pflanzenzellen unter den Bedingungen in der Pflanze Octopin synthetisieren. Uns erscheint das Auftreten des Octopins im Tumor vergleichbar dem Auftreten von Phytoalexinen nach Infektion von Pflanzen mit verschiedenen Pilzen [6], wo ebenfalls genetische Information der Pflanze aktiviert wird.

EXPERIMENTELLER TEIL

Anzucht der Agrobakterien erfolgte in Nährbrühe [7] bei 30° unter Belüftung. Zur Infektion wurden Suspensionen von ca. 1 × 10⁹ Bakterien/ml verwendet. Es wurden infiziert: 9 Tage alte Keimlinge von *Helianthus annuus* mit *A. tumefaciens*, Stamm B6 [8]; 3 Monate alte Pflanzen von *Nicotiana tabacum* var. "Tokai" mit *A. tumefaciens* A6.; 7 Wochen alte Pflanzen von *Datura stramonium* mit *A. tumefaciens*, A6. Gut entwickelte Tumore waren nach 2–6 Wochen reif für die Extraktion. Als weitere Quelle für Tumorgewebe diente eine Tumorgewebekultur aus *Vinca rosea* L. [9]. Normalgewebe wurden aus Keimlingen von *H. annuus*, *D. stramonium* und *N. tabacum* gewonnen. Im letzteren Fall wurde ein Gemisch aus 100 Varietäten des Tabak in großen Schalen im Gewächshaus ausgesät, angekeimt und die 0,8–1 cm großen Keimlinge zur Extraktion verwendet. Extraktion der Guanidine wurde modifiziert nach einem angegebenen Verfahren [3]. Eingefrorene Gewebe wurden in der Kälte in 50% Äthanol homogenisiert, durch Zentrifugation (20 min bei 18000 rpm) wurde der Extrakt geklärt. Proteine wurden anschließend durch Zugabe eines gleichen Volumens von siedendem Äthanol gefällt und der Überstand geklärt. Der so erhaltene Extrakt wurde mit

dem Rotations-verdampfer eingeeignet bis zur Trockne, mit H₂O aufgenommen, erneut geklärt und eingefroren. 1 ml dieser Extrakte enthielten lösliche Guanidine aus 20–40 g Gewebe. Guanidinhaltige Extrakte wurden an Säulen von Sephadex G 10 gereinigt [2] und nach Gefriertrocknung in Elektrorese-Puffer übernommen. Hochspannungselektrophorese bei 600 V wurde im Puffer (3% Eisessig, 0,4% Pyridin, pH 3,6) an Cellulose-Platten durchgeführt [2]. Aufgetragen wurden maximal 50 µl (entspricht einem Extrakt aus 5 g Frischgewicht) auf runde Flecken oder maximal 300 µl (entspricht Extrakt aus 20 bis 40 g Frischgewicht) auf Streifen. Dünnschichtchromatographie erfolgte ebenfalls an Cellulose-Platten mit dem Laufmittel Pyridin-Butanol-Wasser (1:1:1). In diesem System war der *R*_f-Wert für reines Octopin 0,22, für reines Arginin 0,13. Im Extrakt weichen die Laufeigenschaften von Octopin und Arginin sowohl für Gelektrophorese als auch für Dünnschichtchromatographie erheblich von denen der Reinsubstanzen ab. Daher wurden stets parallel zu Extrakten und Reinsubstanzen auch Gemische von Extrakt und Reinsubstanz laufen lassen. Nachweis der Guanidine in Lösungen wurde mit dem Diacetyl-Reagens [10] durchgeführt. 30 min nach Beginn der Reaktion wurde die Extinktion bei 530 nm vermessen. Unter den gewählten Bedingungen war sie linear zwischen 20 und 150 nMol/ml Octopin. Nachweis der Guanidine auf Platten erfolgte mit Hilfe der Phenanthren-Chinon-Reaktion [11]. Vor Besprühen wurden alle Fluoreszenzen notiert, die auf Verunreinigungen der Extrakte zurückzuführen waren. Mit dem Phenanthren-Chinon liefern dann die Guanidine bei Bestrahlung mit kurzwelligem UV für einige Stunden eine geebrüne Fluoreszenz, die danach blau wird. Darüberhinaus zeigen die Reaktionsprodukte aus Phenanthren-Chinon und Guanidinen in flüssigem Stickstoff nach Bestrahlung mit UV eine etwa 1 min anhaltende Phosphoreszenz (M. D. Gordon, mündl. Mitteilung). Auch diese Reaktion wurde zur Identifizierung von Octopin benutzt.

Anerkennungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

LITERATUR

1. Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J. und Morel, G. (1970) *Physiol. Vég.* **8**, 205.
2. Wendt-Gallitelli, M. F. und Dobrigkeit, I. (1973) *Z. Naturforsch.* **28c**, 768.
3. Johnson, R., Guderian, R. H., Eden, F., Chilton, M. D., Gordon, M. P. und Nester, E. W. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* **71**, 536.
4. Morel, G., Goldmann, A., Petit, A. und Tempé, J. (1969) Abstr. XI. Intern. Bot. Congr. Seattle, No. 151.
5. Bomhoff, G. H. (1974) Dissertation Leiden.
6. Ingham, J. L. (1973) *Phytopath. Z.* **78**, 314.
7. Lippincott, J. A. und Heberlein, G. T. (1965) *Am. J. Botany* **52**, 396.
8. Beiderbeck, R., Heberlein, G. T. und Lippincott, J. A. (1973) *J. Virol.* **11**, 345.
9. Beiderbeck, R. (1974) *Arch. Mikrobiol.* **97**, 253.
10. Rosenberg, H., Ennor, A. H. und Morrison, J. F. (1956) *Biochem. J.* **63**, 153.
11. Yamada, S. und Itano, H. A. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 538.