

Methylierung von Transfer RNA pflanzlicher Zellen

Methylation of Transfer RNA in Plant Cells

Hartmut Kern

Institut für Botanik und Mikrobiologie, Kernforschungsanlage Jülich

(Z. Naturforsch. 31 c, 209–211 [1976]; eingegangen am 30. Oktober 1975)

Transfer RNA, Methylation, Crown-Gall

The possibility of using 2-methyladenine, previously reported as a specific component of prokaryotic tRNA, as a marker for the presence of bacterial informations in plant tumour cells was investigated. Normal and transformed, bacteria-free, tobacco cells exhibited slightly different methylation patterns in their tRNA. However, 2-methyladenine was present in both normal and transformed cells. This makes it impossible to detect the occurrence of tRNA from tumour-inciting bacteria in crown-gall cells on the basis of methylation patterns.

Die unter dem Einfluß von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgende Umwandlung normaler Pflanzenzellen in Tumorzellen (Crown-gall) ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Es gilt als erwiesen, daß die bakterielle DNA in enger Beziehung zur Tumorentstehung steht^{1–5}. In Analogie zur Transformation von Säugetierzellen durch DNA-haltige Tumorviren^{6, 7} wurde ein ähnlicher Modus auch für die Entstehung pflanzlicher Tumoren postuliert. Aus ersten DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten wurde gefolgt, daß DNA aus *A. tumefaciens* permanenter Bestandteil des Tumogenoms sein müsse. Da die Integration, die Replikation und die Expression bakterieller DNA in Tumorzellen gesichert schienen, wurden entsprechende Modelle der Tumorentstehung entwickelt. In jüngster Zeit wurden jedoch Zweifel an diesen Vorstellungen geäußert. Bei Anwendung verfeinerter Hybridisierungstechniken^{8, 9} ließ sich in pflanzlichen Tumorgeweben nicht mit Sicherheit Bakterien-DNA nachweisen. So schließen Drlica *et al.*⁸ und Farrand *et al.*⁹, daß aufgrund der methodisch gegebenen Nachweisgrenzen nur sehr geringe Mengen an bakterieller DNA vorhanden sein können. Grundsätzlich aber schließen diese Experimente nicht aus, daß „a small fraction of the bacterial genome is in the tumor cell“⁹. Unabhängig davon, ob geringe Mengen an DNA aus *A. tumefaciens*, aus Plasmiden¹⁰ oder Bakteriophagen¹¹ in den Tumorzellen essentiell sind, ergibt sich die Notwendigkeit, mit anderen Methoden zu prüfen, wieweit Hinweise für das

Sonderdruckanforderungen an H. Kern, KFA-Botanik, Postfach 365, D-5170 Jülich.

Vorhandensein exogener DNA überhaupt zu erlangen sind. Im Hinblick auf Angaben in der Literatur, wonach eine Expression bakterieller Informationen in Crown-gall-Zellen stattzufinden scheint^{12, 23}, wäre auch mit transkribierter Bakterien-RNA¹⁹ zu rechnen.

Als analytischer Beitrag zu dieser Frage wurde untersucht, ob RNA prokaryotischer Herkunft in Tumorzellen nachweisbar ist, die sich eventuell von *A. tumefaciens* ableiten ließe. Wenn tatsächlich bakterielle DNA in den Tumoren vorhanden ist, es sich hierbei um sehr kleine Fraktionen des Bakteriengenoms handelt und möglicherweise auch eine Transkription erfolgt, so könnte niedermolekulare RNA wie z. B. tRNA als Indikator für die Gegenwart von Bakterien-DNA herangezogen werden. Systematische Untersuchungen von Klagsbrun^{14, 15} haben ergeben, daß der Methylierungsgrad von tRNA eine hohe Spezifität aufweist, die eine Differenzierung zwischen pro- und eukaryotischer RNA ermöglicht. Dabei eignen sich einige methylierte Basen als charakteristische Indikatoren. So ist 2-Methyladenin Bestandteil von tRNA verschiedener Prokaryoten und ist auch in mitochondrialer tRNA von Säugetierzellen nachweisbar. Im Widerspruch hierzu stehen Befunde von Dubin *et al.*¹⁶. Diese Autoren konnten weder in cytoplasmatischer noch in mitochondrialer tRNA aus tierischen Zellen einen eindeutigen Nachweis von 2-Methyladenin führen. Sie bestätigen jedoch, daß diese Base ein typischer Baustein von bakterieller tRNA ist.

Wie im experimentellen Teil beschrieben, untersuchten wir tRNA-Präparate aus einem virulenten Stamm von *A. tumefaciens* und aus Kulturen von Normal- und Tumorzellen. Es handelt sich hierbei um Dauerkulturen von Tabakzellen. Die Tumorzellen unterscheiden sich von den Normalzellen durch ihre Wuchsstoffautonomie und das Vorkommen von Octopin, das als tumorspezifisch angesehen wird¹⁷. Nach *in-vivo*-Methylierung mit [¹⁴C]Methionin wurden die betreffenden Präparate mit Trifluoressigsäure hydrolysiert, die Hydrolysate zweidimensional auf Dünnschichtplatten getrennt, die Lokalisierung der radioaktiven methylierten Basen durch Autoradiographie vorgenommen und die Radioaktivität der einzelnen Flecke im Flüssigkeitsscintillationsspektrometer gemessen. Zur eindeutigen Identifizierung standen reines 1-Methylhypoxanthin, 1-Methylguanin und 2-Methyladenin zur Verfügung. Letzteres wurde den einzelnen Hydrolysaten als interner Standard zugesetzt. Die übrigen methylierten Basen wurden in Analogie zu den in den Arbeiten von Klagsbrun^{14, 15} abgebildeten Fingerprints benannt.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. Bestimmung von methylierten Basen in tRNA-Präparaten.

Bezeichnung der Flecke		Substanz	Prozentuale Zusammensetzung		
Abb. 1	Abb. 2		Bakterium: <i>A. tumefaciens</i>	Tabakzellen: Normalzellen	Tabakzellen: Tumorzellen
a	1	1-Methylguanin ⁺ + 7-Methylguanin	68,3 – 70,5	17,4 – 18,9	19,5 – 19,9
b	—	N.N.	0,4 – 0,8	—	—
c	—	N.N.	0,5 – 0,7	—	—
—	2	N ² -Methylguanin	—	9,6 – 11,0	10,3 – 15,0
—	3	N ² -Dimethylguanin + 1-Methylhypoxanthin ⁺	—	21,2 – 22,3	17,4 – 17,9
—	4	1-Methyladenin	—	14,4	14,0 – 14,3
m ² A	m ² A	2-Methyladenin ⁺	26,2 – 28,1	3,7 – 4,1	4,7
d	5	5-Methylcytosin	0,4 – 0,6	7,6 – 8,2	7,0 – 7,2
—	6	2-O-Methyluridin	—	7,4 – 8,1	7,6 – 8,8
e	—	N.N.	0,4 – 0,7	—	—
f	7	5-Methyluridin	0,6 – 0,9	12,2 – 13,7	11,7 – 17,4
—	8	N.N.	—	4,0 – 4,5	1,1 – 1,3

Die Bezeichnung der [¹⁴C]methylierten Basen in den Hydrolysaten der jeweiligen tRNA-Präparate erfolgte in Analogie zu Klagsbrun^{14, 15}. Die mit ⁺ versehenen Substanzen standen als Referenz zur Verfügung. Der prozentuale Anteil der einzelnen Basen wurde auf die Summe aller durch Autoradiographie lokalisierter Flecke (100%) bezogen. Die angeführten Werte geben den Bereich an, der sich bei der Auswertung von je zwei verschiedenen tRNA-Präparaten aus getrennten *in-vivo*-Markierungen mit [¹⁴C]Methionin ergab. Die Gesamtaktivität betrug bei *A. tumefaciens* 4418 bzw. 7474 cpm, bei Tabak-Normalzellen 1524 bzw. 2266 cpm und bei Tabak-Tumorzellen 1325 bzw. 1600 cpm.

Zunächst zeigte die Analyse von tRNA aus *A. tumefaciens*, daß 2-Methyladenin ein wesentlicher Bestandteil dieser RNA ist. Mit ca. 27% macht diese Base zusammen mit Spot a (1-Methylguanin + 7-Methylguanin) ca. 96% der Gesamtaktivität aus. Alle übrigen methylierten Basen lagen unterhalb von 1% (Abb. 1* und Tab. I). Entsprechende Untersuchungen an unfractionierter tRNA aus ganzen Normal- und Tumorzellen ergaben in beiden Fällen das Vorhandensein von 2-Methyladenin (Abb. 2 und Tab. I). Durch die Verwendung von 1-Methylhypoxanthin als Referenz wurde sichergestellt, daß diese Base in enger Nachbarschaft von 2-Methyladenin liegt, jedoch von diesem getrennt wird. 1-Methylhypoxanthin war an der oberen Spitze von Spot 3 (N²-Dimethylguanin) lokalisierbar und wurde bei der Auswertung der DC-Platten mit N²-Dimethylguanin vereinigt (Tab. I). Der Anteil von 2-Methyladenin lag bei 4% der Gesamtaktivität sämtlicher lokalisierbarer [¹⁴CH₃]Basen und ließ keinen Unterschied zwischen beiden Zelltypen erkennen. In Hydrolysaten von tRNA aus postmitochondrialen Überständen, die als cytoplasmatische tRNA aufgefaßt werden kann^{14, 15}, war 2-Methyladenin nicht mit Sicherheit nachweisbar.

Dieses Ergebnis könnte im Sinne von Klagsbrun^{14, 15} interpretiert werden, wonach 2-Methyladenin den prokaryotischen Charakter der mitochondri-

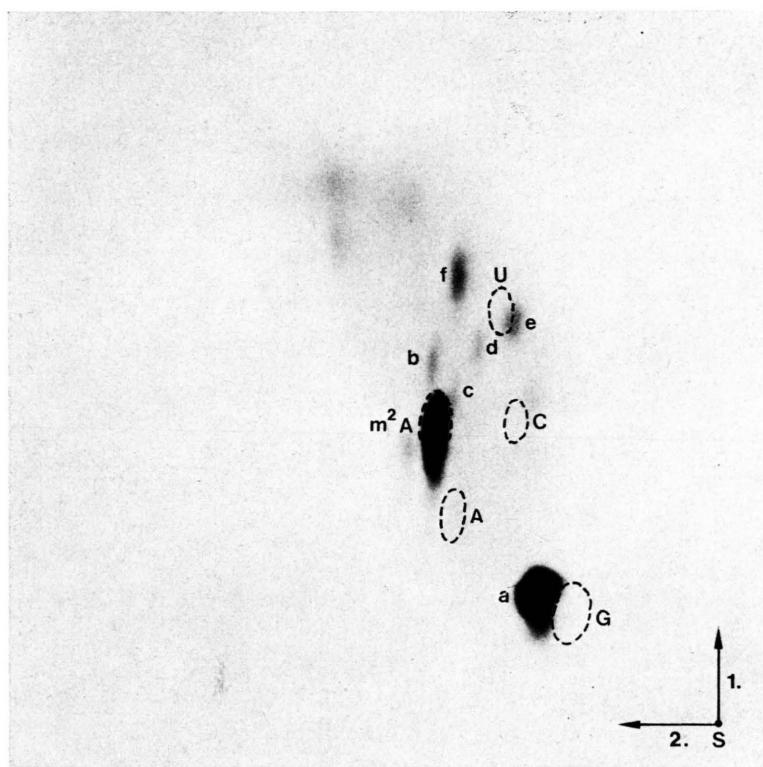
drialen tRNA anzeigt. Für die vorliegende Fragestellung jedoch ist es wichtig, daß diese Base in sterilen normalen und transformierten Zellen in ungefähr gleichen Mengen vorkommt. Somit scheidet 2-Methyladenin als möglicher Indikator für bakterielle tRNA in den Tumorzellen aus. Auch ist es unwahrscheinlich, daß eine Transkription von tRNA erfolgt, die sich auf vorhandene Bakterien-DNA zurückführen ließe. Da z. Z. die permanente Gegenwart bakterieller DNA in Tumorzellen überhaupt in Frage gestellt wird, sind die erhaltenen Resultate nicht überraschend.

Unabhängig von der hier behandelten Fragestellung lassen sich im Methylierungsmuster der tRNA beider Pflanzenzelltypen quantitative Unterschiede besonders bei den Derivaten von Guanin (Tab. I, Spot 1 – 3) erkennen. Wenngleich Modifikationen der tRNA in neoplastischen Zellen diskutiert werden¹⁸, so können die Unterschiede im vorliegenden Fall auch Ausdruck der Kulturbedingungen sein und müssen nicht unbedingt tumorspezifisch sein.

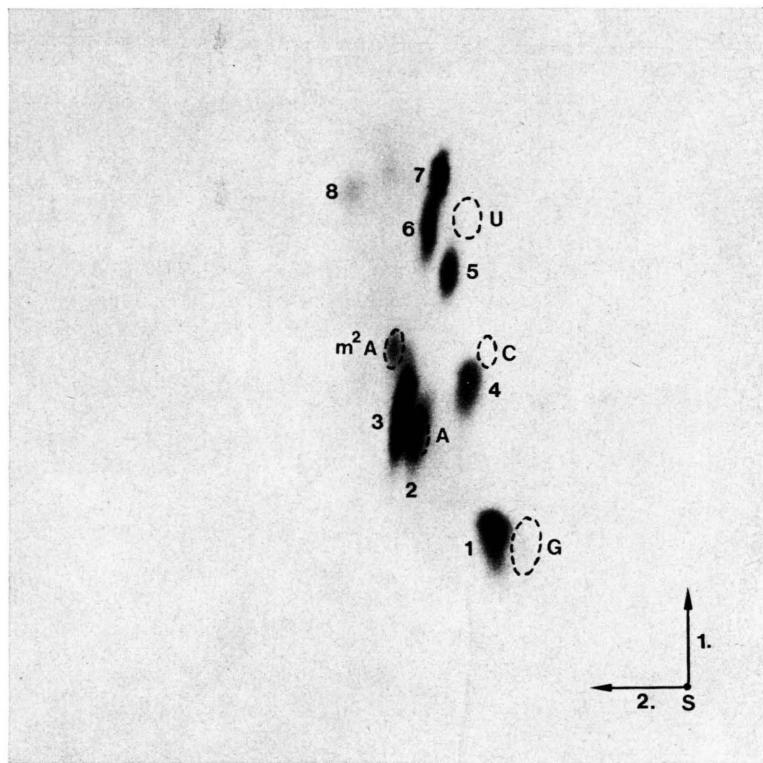
Experimentelles

Für die Untersuchungen wurde der virulente Stamm 147 von *Agrobacterium tumefaciens*²⁰, der vermutlich mit Stamm B₆ identisch ist, in M₁-Medium²⁰ bei 27 °C kultiviert. Bei den Pflanzenzellen

* Abb. 1 u. 2 siehe Tafel auf Seite 210 a.



Abbn. 1 u. 2. Autoradiographien hydrolysiertes tRNA aus *A. tumefaciens* (Abbn. 1) und aus Tabakzellen (in Abbn. 2 Hydrolysat von tRNA aus Normalzellen). Die Trifluoressigsäure-Hydrolysate wurden auf DC-Cellulose-Platten in der ersten Laufrichtung mit Methanol-HCl-H₂O (7:2:1 v/v) und in der zweiten Richtung mit *n*-Butanol-Essigsäure-H₂O (4:1:1 v/v) aufgetrennt. Als interner Standard diente 2-Methyladenin. Die im UV-Licht lokalisierbaren Basen sind gestrichelt dargestellt: G = Guanin; A = Adenin; C = Cytosin; m²A = 2-Methyladenin. Bei U handelt es sich um Uridin^{14,15}. Die Expositionszeit betrug bei tRNA aus *A. tumefaciens* 4 Wochen und bei tRNA aus Tabakzellen 2 Monate.



handelt es sich um sterile Dauerkulturen von Tabakgewebe. Als „Normal“-Typ wurden Zellsuspensionen in MID-Medium²¹ benutzt. Die Tumorzellen leiten sich von einer Induktion durch *A. tumefaciens* Stamm B₆ ab. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Morel (Versailles) zur Verfügung gestellt und seit 1972 in unserem Labor auf Agar-Nährboden¹³ gezogen. Vor Beginn der Einbauversuche mit [¹⁴C]Methionin wurde Tumorkallus in kleine Stücke zerlegt, im gleichen Medium¹³ ohne Agar suspendiert und 24 h an die Inkubationsbedingungen angepaßt.

Die Inkubationen in Gegenwart von [¹⁴C]Methionin [L-Methionin(methyl-¹⁴C), 56 mCi/mmol] erfolgten in den betreffenden Medien, die zur Vermeidung eines Einbaues von ¹⁴C in den Purin- bzw. Pyrimidinring der tRNA Adenosin (10^{-4} M) und Uridin (2×10^{-5} M) enthielten. Bakterienkulturen in der log-Phase wurden 3 h bei 27 °C im Schüttelbad mit 1,3 µCi [¹⁴C]Methionin/ml und beide Zelltypen von Tabak jeweils 48 h in Gegenwart von 2 µCi [¹⁴C]Methionin/ml bei 25 °C inkubiert.

Die Extraktion der Nucleinsäuren erfolgte in allen Fällen nach der Methode von Kirby²² unter Verwendung von Phenol-Kresol. Die Bakterien wurden dabei vorher mit Lysozym und Pronase-Sarkosyl

nach den Angaben von Zaenen *et al.*¹⁰ lysiert. Nach der Fällung der ribosomalen RNA durch 3 M Kaliumacetat²² folgte die Präzipitierung von tRNA und DNA mit Äthanol. Der in 0,1 × SSC + 0,002 M MgCl₂ gelöste Niederschlag wurde mit DNase (50 µg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C gehalten. Nach Deproteinisierung mit Chloroform-Isoamylalkohol, Fällung mit Äthanol und Lösen des Niederschlages in 0,1 M Trisacetat, pH 8, erfolgte die Deacylierung der tRNA 20 min bei 37 °C. Die Reindarstellung von tRNA geschah nach der Methode von Vanderhoef *et al.*²⁴ durch säulenchromatographische Fraktionierung an DEAE-Cellulose in der Cl⁻-Form. In einigen Fällen extrahierten wir in entsprechender Weise tRNA aus Mitochondriensedimenten bzw. aus den jeweiligen Überständen (Cytoplasma), die nach Stutz und Noll²³ gewonnen wurden.

Bei der Hydrolyse der tRNA mit Trifluoressigsäure, der Trennung der Hydrolysate aus DC-Cellulose-Platten (mit Fluoreszenzindikator) und der Anfertigung von Autoradiographien verfuhren wir nach den Vorschriften von Klagsbrun^{14, 15}. Die Bestimmung der Radioaktivität in den ausgeschnittenen Flecken der Chromatogramme erfolgte in Gegenwart von Instagel (Packard) in einem Tri-Carb-Spektrometer.

- ¹ A. C. Braun u. T. Stonier, *Protoplasmatologia* **Vol. X**, 5a, pp. 1 [1958].
- ² R. A. Schilperoort H. Velstra, S. Warnaar, G. Mulder u. J. A. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 523 [1967].
- ³ F. Quétier, T. Huguet u. E. Guille, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**, 128 [1969].
- ⁴ B. I. S. Srivastava, *Life Sci.* **9**, 889 [1970].
- ⁵ M. Patillon, *J. Exp. Bot.* **25**, 860 [1974].
- ⁶ H. Westphal u. R. Dulbecco, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1158 [1968].
- ⁷ U. Petersson u. J. Sambrook, *J. Mol. Biol.* **73**, 125 [1973].
- ⁸ K. A. Drlica u. C. I. Kado, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **71**, 3677 [1974].
- ⁹ S. K. Farrand, F. C. Eden u. M.-D. Chilton, *Biochim. Biophys. Acta* **390**, 264 [1975].
- ¹⁰ I. Zaenen, N. Van Larebeke, H. Teuchy, M. van Montagu u. J. Schell, *J. Mol. Biol.* **86**, 109 [1974].
- ¹¹ M.-D. Chilton, T. C. Currier, S. K. Farrand, A. J. Bendich, M. P. Gordon u. E. W. Nester, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **71**, 536 [1974].
- ¹² R. A. Schilperoort, W. H. Meijs, G. M. W. Pippel u. H. Veldstra, *FEBS Lett.* **3**, 173 [1969].
- ¹³ K. C. Chadha u. B. I. S. Srivastava, *Plant Physiol.* **48**, 125 [1971].
- ¹⁴ M. Klagsbrun, *J. Biol. Chem.* **248**, 2606 [1973].
- ¹⁵ M. Klagsbrun, *J. Biol. Chem.* **248**, 2612 [1973].
- ¹⁶ D. T. Dubin u. D. A. Friend, *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 269 [1974].
- ¹⁷ R. A. Schilperoort u. G. H. Bomhoff, *Genetic Manipulations With Plants* (ed. L. Ledoux), pp. 141, Plenum Publ. Corp., New York 1975.
- ¹⁸ Symposium: Transfer RNA and Transfer RNA Modification in Differentiation and Neoplasia. *Cancer Res.* **31**, pp. 591 [1971].
- ¹⁹ G. E. Milo u. B. I. S. Srivastava, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**, 196 [1969].
- ²⁰ H. Kern, *Arch. Mikrobiol.* **52**, 206 [1965].
- ²¹ Ph. Filner, *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 299 [1966].
- ²² K. S. Kirby, *Biochem. J.* **96**, 266 [1965].
- ²³ E. Stutz u. H. Noll, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 774 [1967].
- ²⁴ L. N. Vanderhoef, R. F. Bohannon u. J. L. Key, *Phytochemistry* **9**, 2291 [1970].