

Photosensibilisierung isolierter Mesophyllzellen von Calystegia sepium L.

Photosensibilization of Isolated Mesophyll Cells of Calystegia sepium L.

P. Ries und R. Beiderbeck

Botanisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 360, D-6900 Heidelberg

Z. Naturforsch. 34 c, 1215 – 1217 (1979); eingegangen am 2. August 1979

Photosensibilization, Furocoumarins, Plant Cells, Cell Division

Cell division of isolated mesophyll cells of Calystegia sepium can be made sensitive to long-wave UV (LUV) by treatment with 8-methoxypsoralen (8-MP). The inhibition of cell division depends on 8-MP concentration and the length of light exposure. Only the simultaneous presence of 8-MP and LUV gives effective photosensibilization. Cells treated with 8-MP in the dark can be made non-sensitive to LUV by washing out the furocoumarin prior to irradiation. The furocoumarins may offer a means of cell selection.

Einleitung

Furocoumarine bilden eine Gruppe von Substanzen, die bei Bestrahlung mit langwelligem UV (LUV) von 320 – 400 nm mit den Pyrimidinbasen der DNA reagieren [1, 2, 8]. In lebenden Zellen von Bakterien [2 – 4, 8] und Säugern [2, 8] ist die wichtigste Konsequenz einer solchen Photosensibilisierung die Hemmung der Zellteilung. Für Pflanzenzellen fehlen entsprechende Untersuchungen weitgehend. Lediglich der Einfluß auf größere Gewebekomplexe wie Erbsenhülsen [5] und Wundgewebe [6] wurde untersucht. In diesen Systemen kam es unter Einfluß der LUV-Sensibilisator-Kombination zur Induktion von einzelnen Enzymen [5], zur Einschränkung der Wundreaktion und zur Unterdrückung der Tumorbildung [6]. Hier soll nun die photosensibilisierende Wirkung eines Furocoumarins, des 8-Methoxypsoralens (8-MP) erstmals an pflanzlichen Einzelzellen demonstriert werden.

Material und Methoden

Zellisolierung und Zellkultur

Pflanzen von Calystegia sepium L. wurden bei 32 °C und einer r. F. von ca. 80% in einem Licht-Dunkelwechsel von 16:8 Stunden, mit 5000 Lux Weißlicht während der Lichtphase, angezogen. Aus den Blättern wurden Mesophyllzellen auf mechanischem Wege isoliert und in einem flüssigen Nährmedium NT/3 [7] bei 25 °C im Dunkeln kultiviert.

Sonderdruckerfordernungen an R. Beiderbeck.
0341-0382/79/1200-1215 \$ 01.00/0

Die Bestimmung der Zellzahl und der Lebendzahl erfolgte wie in früheren Experimenten [7].

Furocoumarine

Als Furocoumarin wurde 8-Methoxypsoralen (Roth, Karlsruhe) verwendet. Es wurde in autoklaviertem Medium NT/3 gelöst, dann steril filtriert. Konzentrationsbestimmungen erfolgten durch Messung der Extinktion bei 303 nm. Einer Extinktion von 1,1 entsprachen 20 µg 8-MP/ml.

Bestrahlung

Zellsuspensionen mit und ohne 8-MP wurden für 24 Stunden bei 25 °C im Dunkeln inkubiert, dann

Tab. I. Photosensibilisierung isolierter Zellen von Calystegia sepium in Abhängigkeit von der 8-MP-Konzentration. LUV-Bestrahlung 20 min. Angegeben Mittelwerte aus 3 Experimenten, in Klammern Standardabweichungen. D, Dunkel; LUV, langwelliges UV.

8-MP-Konzentration [µg/ml]	Bestrahlung	Anteil geteilter Zellen an lebenden Zellen [%]
0	D	96 (5,7)
	LUV	98 (1,3)
2	D	87 (17,7)
	LUV	52 (38,4)
4	D	31 (11,3)
	LUV	4 (4,2)
8	D	14 (3,5)
	LUV	1 (1,2)
12	D	1 (2,7)
	LUV	0 (0)
16	D	0 (0)
	LUV	0 (0)



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 digitalized 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.

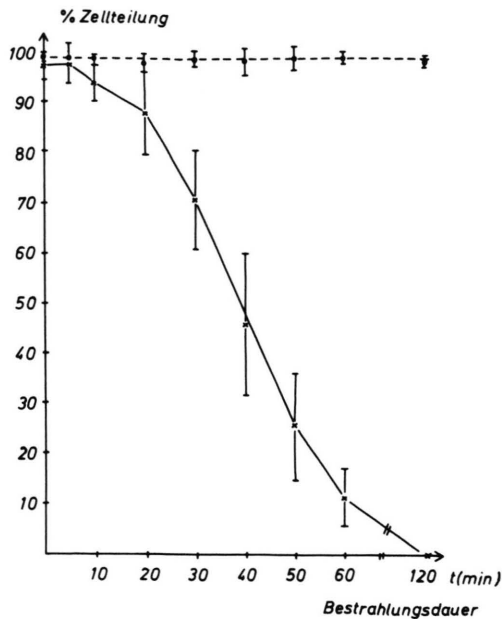


Fig. 1. Die Wirkung der Bestrahlungsdauer auf die Teilung isolierter Mesophyllzellen in Gegenwart (x—x) oder Abwesenheit (●—●) von 2 µg/ml 8-MP. Angegeben Mittelwerte mit Standardabweichungen.

aus 25 cm Abstand mit einer Schwarzglaslampe (Osram L 20 W/73) mit einer spektralen Verteilung zwischen 310 und 420 nm und einer maximalen Strahlungsdichte bei 355 nm unter Ausschluß fremder Lichtquellen bestrahlt.

Auswaschen von 8-MP aus Zellen

24 Stunden nach Zusatz von 8-MP wurden Zellsuspensionen für 1 min bei 900–1000 U/min abzentrifugiert, 3mal mit NT/3-Medium gewaschen und anschließend in NT/3 aufgenommen. Gegebenenfalls wurde 24 Stunden nach einem solchen Waschprozeß mit LUV bestrahlt.

Ergebnisse

1. Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von 8-MP und von LUV auf die Zellteilung

Konzentrationen von 10 µg/ml 8-MP und höher unterdrücken im Dunkeln wie nach Bestrahlung mit LUV die Zellteilung vollständig. Bei Verwendung geringerer Konzentrationen des 8-MP wird unter den gewählten Bedingungen eine Photosensibilisierung der Zellteilung erkennbar. Im LUV ist die Zell-

teilung der Calystegia-Zellen weit stärker gehemmt als im Dunkeln (Tab. I).

2. Die Auswirkung der Bestrahlungsdauer auf die Zellteilung

Neben der 8-MP-Konzentration spielt die Bestrahlungsdauer eine wichtige Rolle bei der Photosensibilisierung der Mesophyllzellen. Bei einer konstanten 8-MP-Konzentration von 2 µg/ml nimmt mit steigender Bestrahlungsdauer die Hemmung der Zellteilung zu (Fig. 1). Nach 120 min Bestrahlungsdauer ist eine vollständige Unterdrückung der Zellteilung erreicht. Bei Verwendung höherer 8-MP-Konzentrationen von 4 µg/ml bzw. 8 µg/ml wird diese vollständige Blockierung der Zellteilung früher, nämlich nach 60 min bzw. 30 min Bestrahlungsdauer erreicht.

3. Revertierung einer 8-MP-Behandlung

Zellen, die langfristig in Konzentrationen von 10 µg/ml 8-MP und mehr inkubiert werden, sterben in LUV und im Dunkeln gleichermaßen ab (Tab. I). Einmal aufgenommenes 8-MP läßt sich aber aus Calystegia-Zellen wieder entfernen durch Medienwechsel oder Waschen der Zellen. Wenn das innerhalb 24 Stunden nach der Zufuhr des 8-MP und dazu im Dunkeln geschieht, dann üben anschließende LUV-Bestrahlungen keine photosensibilisierende Wirkung mehr aus, die Zellteilung läuft ungehindert

Tab. II. Die Aufhebung des 8-MP-LUV-Effektes durch Medienwechsel oder Auswaschen des 8-MP (10 µg/ml) vor der LUV-Behandlung (20 min). Angegeben Mittelwerte und Standardabweichungen.

Programm	Bestrahlung	Anteil geteilter Zellen an lebenden Zellen [%]
NT/3 → NT/3	D	100 (0)
	LUV	99 (0,9)
NT/3 → Waschen → NT/3	D	97 (1,5)
	LUV	97 (0,9)
NT/3 → Waschen → NT/3 + 8-MP	D	0 (0)
	LUV	0 (0)
NT/3 + 8-MP → NT/3	D	77 (5,8)
	LUV	75 (8,3)
NT/3 + 8-MP → Waschen → NT/3	D	98 (1,4)
	LUV	97 (2,0)
NT/3 + 8-MP → Waschen → NT/3 + 8-MP	D	0 (0)
	LUV	0 (0)

ab, der Sensibilisator ist aus den Zellen verschwunden (Tab. II). 8-MP und LUV müssen gleichzeitig auf die Zellen einwirken, damit Photosensibilisierung wirksam wird.

Diskussion

Die Teilung isolierter Mesophyllzellen von *Calyptegia sepium* kann genau wie die Vermehrung von Viren, Bakterien und tierischen Zellen durch 8-MP lichtempfindlich gemacht werden. Pflanzenzellen verhalten sich gegenüber diesem Furocumarin wie die Zellen anderer Organismengruppen auch. Allerdings liegt die Toleranzgrenze der verwendeten Me-

sophyllzellen niedriger als die anderer Organismen (Lit. s. Einleitung).

Die Möglichkeit der Photosensibilisierung, verbunden mit der Möglichkeit, photochemisch in die Zelle nicht eingebundenes 8-MP wieder auswaschen zu können, öffnet Wege zur Selektion von Zellen. Aus Zellgemischen, deren Partner hinsichtlich der Aufnahme und Empfindlichkeit für 8-MP verschieden sind, lassen sich durch kurze LUV-Bestrahlung unempfindliche Zelltypen anreichern.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

- [1] L. Musajo, G. Rodighiero, G. Colombo, V. Torlone u. F. Dall'Acqua, *Experientia* **21**, 22 (1965).
- [2] R. S. Cole, *Biochim. Biophys. Acta* **217**, 30 (1970).
- [3] W. L. Fowlks, D. G. Griffith u. E. L. Oginsky, *Nature* **181**, 571 (1958).
- [4] E. L. Oginsky, G. S. Green, D. G. Griffith u. W. L. Fowlks, *J. Bacteriol.* **78**, 821 (1959).
- [5] L. A. Hadwiger, *Plant Physiol.* **49**, 779 (1972).
- [6] R. Beiderbeck, *Z. Naturforsch.* **29 c**, 572 (1974).
- [7] R. Beiderbeck, *Phytopath. Z.* **82**, 308 (1875).
- [8] F. Carlassare, F. Baccichetti, F. Bordin u. L. Anselmo, *Z. Naturforsch.* **33 c**, 92 (1978).