Zawartość związków fosforu i białek w tumorach pochodzenia bakteryjnego i chemicznego u *Datura stramonium* L.

Phosphorus compounds and proteins in tumours of bacterial and chemical origin of Datura stramonium L.

W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA i H. URBANEK

WSTĘP

Dążąc do wyjaśnienia procesu przekształcania się tkanek normalnych w tumorowe, wiele uwagi poświęca się zagadnieniu czynnika tumorotwórczego. Niektórym autorom bowiem (Brown i Gardner 1936, Kraus, Brown i Hammer 1936, Link, Wilcox i Link 1937, Levine i Chargaff 1937, Gautheret 1946, 1947, Camus i Gautheret 1948, Czosnowski 1948, 1952, de Ropp 1947, 1950) udało się wywołać tumory u szeregu roślin nie tylko przez zakażenie ich *Agrobacterium tumefaciens*, ale również na drodze chemicznej za pomocą substancji wzrostowych typu auksyn.

Jeśli chodzi o porównanie mechanizmu działania *Agrobacterium tumefaciens* i auksyn jako czynników tumorotwórczych, to de Ropp (1950) uważa, że działanie kwasu β -indolooctowego jako regulatora wzrostu polega raczej na pobudzeniu rozmnażania się komórek tumora i ich rozrostu, nie wywołując przy tym zmian jakościowych charakteru mutagennego, jakie może wywołać *Agrobacterium tumefaciens*. Dla bardziej jednak wszechstronnego wyjaśnienia tych różnic niezbędne są badania porównawcze metabolizmu tkanek tumorowych różnego pochodzenia. Jedną z nielicznych pozycji na ten temat są obok prac Gauthereta (1948), Camusa i Gauthereta (1948a, b), Kleina, Rush i Swifta (1953) i Czosnowskiego (1948) badania Czosnowskiego (1952), który opracował bardzo szczegółową charakterystykę chemiczną i enzymatyczną trzech typów tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bakteryjnego i tumora chemicznego, hodowanych in vitro

Celem niniejszej pracy było porównanie zawartości związków fosforu i azotu białkowego w tumorach pochodzenia bakteryjnego i pochodzenia chemicznego u *Datura stramonium* L.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły tumory bakteryjne i tumory chemiczne wywołane na łądych *Datura stramonium*.

Tumory bakteryjne wywoływano przez zakażenie łądyg *Agrobacterium tumefaciens* za pomocą igły platynowej. Tumory chemiczne otrzymywano przez wprowadzenie kwasu β -indolooctowego za pomocą strzykawki lekarskiej do miejsc uprzednio zranionych łądygi *Datura*. Wprowadzenie auksyny do miejsc zranionych powtarzano w ciągu pierwszych 10 dni doświadczenia co 2 dni, w okresie późniejszym, to znaczy wzroście tumora, w odstępach 4-dniowych.

Po 8 tygodniach wzrostu tumory bakteryjne i tumory chemiczne poddawano analizom na zawartość związków fosforu i azotu białkowego.

Frakcjonowanie związków P wykonano metodą opisaną przez Holden (1952), a polegającą na rozfrakcjonowaniu związków fosforu na 4 grupy:

1. Rozpuszczalne w zimnym $0,2 \text{ NHClO}_4$ około 3 g próbki badanego materiału rozciera się w moździerzu porcelanowym z 20 ml $0,2 \text{ NHClO}_4$. Należy zwracać przy tym uwagę, aby nie pozostawiać tkanki w kontakcie z kwasem dłużej niż 10 minut. Po oddzieleniu ekstraktu od roztartej tkanki przez odwirowanie przy 2400 obr/min, tkankę przemywa się 10 ml $0,2 \text{ NHClO}_4$, odwirowuje, a otrzymany ekstrakt dołącza się do pierwszego. W tej frakcji oznacza się P całkowity. W skład tej frakcji wchodzi fosfor nieorganiczny i P związany.

2. Rozpuszczalne w etanolu-eterze-frakcja lipidowa. Trzy stosowane kolejno porcje: 20, 10 i 10 ml zimnej, neutralnej mieszaniny etanolu-eteru (3 : 1) wystarczają zazwyczaj do wyekstrahowania frakcji lipidowej. Przemywanie próbki etanolem-eterem należy powtarzać aż do całkowitego usunięcia z niej barwników. Ekstrakty łączy się.

3. Rozpuszczalne w NHClO_4 przy temperaturze pokojowej — frakcja KRNP. Próbkę ekstrahuje się 20 ml NHClO_4 w ciągu 16—18 godzin przy temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu ekstraktu przemywa się ją 10 ml NHClO_4 , oba ekstrakty łączy się.

4. Rozpuszczalne w NHClO_4 przy temperaturze 37°C — frakcja KDNP. Przygotowuje się identycznie jak frakcję 3, stosując inkubowanie próbek w temperaturze 37°C .

Zawartość P poszczególnych frakcji oznaczano metodą Kuttnera i Lichtensteina w modyfikacji Holden i Pirie (1955).

W pozostałości rozdrobnionych tkanek po wyekstrahowaniu związków fosforu oznaczano zawartość azotu białkowego. Zawartość N oznaczano mikrometodą Kjeldahla opisaną przez Biełozierskiego (1954).

Dla kontroli wykonywano analogiczne analizy łodyg roślin zdrowych. Doświadczenia powtórzono dwukrotnie.

WYNIKI

Tumory wywołane kwasem β -indolooctowym miały wygląd bardzo podobny do wyglądu tumorów bakteryjnych. Tumory bakteryjne i tumory chemiczne pojawiały się na łodygach w tym samym mniej więcej czasie, ale tumory chemiczne rosły wolniej i nie osiągały takich rozmiarów jak tumory bakteryjne, co ilustruje załączona fotografia.

Fig. 1

a — tumor bakteryjny (tumour of bacterial origin), b — tumor chemiczny (tumour of chemical origin)

Należy też zaznaczyć, że konieczne było kilkakrotne traktowanie rosnących już tumorów chemicznych kwasem β -indolooctowym. W przeciwnym bowiem razie tumory te rosły bardzo słabo.

Dla wywołania tumorów chemicznych duże znaczenie posiadało stężenie kwasu β -indolooctowego. Przy zastosowaniu bowiem stężeń niższych lub wyższych od 0,015 M tumory nie powstawały. Przy stężeniach niższych od 0,015 M w miejscach zranienia łodygi powstawały zazwyczaj korzenie przybyszowe, przy dawkach wyższych natomiast rośliny marniały i zamierały. Na podkreślenie zasługuje fakt, że przy stężeniu auksyny 0,015 M rośliny z tumorami rosły jednak znacznie słabiej w porównaniu z kontrolnymi i z zakażonymi *Agrobacterium tumefaciens*.

Porównanie zawartości frakcji fosforowych i azotu białkowego w łodygach, tumorach bakteryjnych i tumorach chemicznych *Datura stramonium* przedstawia tabela 1.

Tabela 1 — Table 1

Zawartość związków fosforu i białek w tumorach pochodzenia bakteryjnego i chemicznego u *Datura stramonium* w mg/g suchej masyPhosphorus compounds and proteins in tumours of bacterial and chemical origin of *Datura stramonium* per mg/g of dry matter

	Łodyga Stem		Tumor bakteryjny Tumor of bacterial origin		Tumor chemiczny Tumor of chemical origin	
	doświadczenie I experiment I	doświadczenie II experiment II	doświadczenie I experiment I	doświadczenie II experiment II	doświadczenie I experiment I	doświadczenie II experiment II
P kwasorozpuszczalny Acid-soluble P	0,665 ± 0,017	0,634 ± 0,030	4,825 ± 0,051	5,060 ± 0,026	2,807 ± 0,026	2,715 ± 0,035
P lipidowy lipid P	0,508 ± 0,037	0,465 ± 0,022	1,284 ± 0,052	1,198 ± 0,037	0,940 ± 0,046	0,888 ± 0,048
KRN P RNAP	0,265 ± 0,007	0,282 ± 0,014	0,787 ± 0,012	0,790 ± 0,016	0,529 ± 0,012	0,480 ± 0,015
KDN P DNAP	0,095 ± 0,005	0,107 ± 0,006	0,410 ± 0,009	0,382 ± 0,009	0,318 ± 0,011	0,311 ± 0,013
P całkowity total P	1,533	1,488	7,306	7,430	4,594	4,394
N białkowy protein N	8,25 ± 0,25	8,50 ± 0,30	22,88 ± 0,36	23,34 ± 0,58	21,65 ± 0,65	19,91 ± 0,46
PKRN/PKDN RNAP/DNAP	2,7		2,0		1,6	

Liczby przedstawiają średnią arytmetyczną 4 oznaczeń ± odchylenie standardowe

All figures represent averages of quadruplicate determinations ± standard deviation.

Jak wynika z powyższego zestawienia zawartość związków fosforu i azotu białkowego w tumorach przewyższa znacznie ich zawartość w łądygach. W tumorach jednak pochodzenia bakteryjnego nagromadzenie tych związków jest większe niż w tumorach wywołanych chemicznie. W tumorach bakteryjnych bowiem, ogólna zawartość związków P przewyższa zawartość tych związków w łądygach prawie 5-krotnie, w tumorach zaś chemicznych około 3-krotnie. Największe różnice w zawartościach związków P różnego pochodzenia spotykamy głównie we frakcji I, to znaczy rozpuszczalnej w 0,2 N HCl₄. W tumorach bakteryjnych znajdujemy około 7, a w tumorach chemicznych około 4,5 razy więcej P tej frakcji niż w łądygach. We frakcji III — KRNP, zawartość P tumorów bakteryjnych przewyższa około 3-krotnie, a tumorów chemicznych około 2-krotnie zawartość KRNP w łądygach. Zawartość fosforu innych frakcji w tumorach przewyższa również 2-4-krotnie zawartość P odpowiednich frakcji w łądygach, ale różnice pomiędzy tumorami różnego pochodzenia są pod tym względem niewielkie.

Jeśli chodzi o stosunek PKRN/PKDN, to stwierdzono spadek jego wartości w tumorach w porównaniu z łądygą, przy czym spadek ten jest większy w tumorach chemicznych niż bakteryjnych.

Zawartości N białkowego w tumorach pochodzenia bakteryjnego i chemicznego są podobne i przewyższają prawie 3-krotnie zawartości N białkowego w łądygach. Poniżej przedstawiono stosunki zawartości P kw. nukleinowych do N białkowego w badanych tkankach:

		Łodyga Stem	Tumor bakter. Tum. of bact. orig.	Tumor. chem. Tum. of chem. orig.
PKRN/N białk.	RNAP/prot. N	32,66	34,41	24,29
PKDN/N białk.	DNAP/prot. N	12,0+	17,13	15,14

Jak widać z tej tabelki zawartość PKRN w przeliczeniu na N białkowy w łądygach i tumorach bakteryjnych jest podobna, natomiast w tumorach chemicznych jest wyższa. Jeśli chodzi o zawartość PKDN w odniesieniu do N białkowego, to zarówno w tumorach bakteryjnych jak i chemicznych jest ona nieco wyższa niż w łądydze.

DYSKUSJA

Reasumując wyniki niniejszych badań nad zawartością związków fosforu i białek w tumorach różnego pochodzenia u *Datura stramonium*, ogólnie można powiedzieć, że zawartość tych związków w tumorach zarówno pochodzenia bakteryjnego, jak i chemicznego jest znacznie wyższa niż w łądygach.

Klein, Rush i Swift (1953) analizując tumory wywołane przez *Agrobacterium rubii* u *Vicia faba* stwierdzili, że zawartość KDN w tu-

morach bakteryjnych po znacznych wahaniach w ciągu kilku pierwszych dni po zakażeniu ustalała się wreszcie na poziomie nieco wyższym od kontroli. W zawartości KRN nie stwierdzili istotnych zmian.

W tumorach wywołanych kwasem β -indolooctowym zawartości frakcji KRN i KDN różniły się bardzo nieznacznie od zawartości analogicznych frakcji w łądygach.

C z o s n o w s k i (1952) porównując zawartość N całkowitego i N białkowego w tumorach wywołanych przez *Agrobacterium tumefaciens* i tumorach chemicznych wywołanych kwasem α -naftalenooctowym na tkankach *Vitis vinifera*, hodowanych in vitro stwierdził, że zawartości tych frakcji w tumorach były niższe niż w tkankach normalnych, przy czym zawartość azotu białkowego w tumorach chemicznych była niższa niż w bakteryjnych.

Różnice wyników niniejszej pracy i badań przytoczonych wyżej autorów, dotyczące zawartości azotu białkowego i kwasów nukleinowych w tumorach, są bardzo trudne do interpretacji, ponieważ dotyczą różnego materiału roślinnego.

Zmiany ilościowe białek i kwasów nukleinowych tumorów różnego pochodzenia nie mogą jednak dać pełnego wyjaśnienia podobieństwa względnie różnicy między tumorami bakteryjnymi i chemicznymi. Stwierdzony przez nas znaczny przyrost zawartości frakcji fosforowych i białek zarówno w tumorach bakteryjnych, jak i chemicznych nie decydują jeszcze o ich zupełnym podobieństwie. Tumory chemiczne bowiem charakteryzowały się nieco niższymi stosunkami PKRN/N białkowy i PKRN/PKDN niż tumory bakteryjne.

Ponadto tumory chemiczne wymagały do swego wzrostu stałego dostawiania kwasu β -indolooctowego, natomiast tumory bakteryjne, jak wiadomo (B r a u n i S t o r n i e r 1958), nie są wrażliwe na działanie substancji wzrostowych typu auksyn.

Być może, że badania składu chemicznego kwasów nukleinowych i białek tumorów różnego pochodzenia mogłyby rzucić pełniejsze światło na istotę procesu tumorowacenia.

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było przebadanie zawartości związków fosforu i białek w tkankach łądyg zdrowych i w tumorach *Datura stramonium*.

Porównywano tumory wywołane przez *Agrobacterium tumefaciens* oraz przez kwas β -indolooctowy.

Zawartość fosforu całkowitego i białek wyrażona w mg/g suchej masy była znacznie wyższa w tumorach niż w łądygach *Datura*.

Przyrost ten zachodził głównie dzięki zwiększaniu się zawartości P frakcji kwasorozpuszczalnej. Zawartość P tej frakcji była około 7 razy wyższa w tumorach

rach pochodzenia bakteryjnego, a prawie 4,5 raza wyższa w tumorach wywołanych kwasem β -indolooctowym niż w zdrowych łodygach.

Zawartość KRNP była około 3 razy wyższa w tumorach wywołanych przez bakterie i około 2 razy wyższa w tumorach spowodowanych kwasem β -indolooctowym niż w łodygach.

Wysoki przyrost (2—4 razy) stwierdzono również w innych frakcjach fosforowych (lipidowej, KDN) i białkach, ale przyrost ten był prawie jednakowy zarówno w tumorach bakteryjnych, jak i chemicznych.

Katedra Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 22.I.1962 r.)

SUMMARY

The present paper is concerned with the determination of the phosphorus compounds and proteins in healthy and tumorous *Datura* stem tissues.

Tumours induced by *Agrobacterium tumefaciens* and those caused by β -indoleacetic acid were compared.

In the tumours the total phosphorus and proteins per mg/g of dry matter were significantly higher than in the stems of *Datura*.

This increase was due mainly to an increased amount of P of the acid-soluble P fraction. The acid soluble P was nearly 7 times higher in tumours of bacterial origin and about 4,5 times higher in those caused by IAA than in healthy stems.

RNAP was about 3 times higher in tumours induced by bacterial agent and 2 times higher in those caused by IAA than in healthy stems.

The high increase (2—4 times) was noticed also in other P fractions (lipid-P, DNA-P) and proteins but this increase was approximately the same in both: bacterial and chemical tumours.

LITERATURA

- Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, Ćwiczenia z biochemii roślin. 42—48, Warszawa.
- Braun A. C., Stornier T., 1958, Protoplasmatologia 10 (5 A), 1—93.
- Brown N. A., Gardner F. E., 1936, Phytopath. 26: 708—713.
- Camus G., Gautheret R. J., 1948 a, C.R.Ac.Sc. 226: 744—755.
- Camus G., Gautheret R. J., 1948 b, C. R. Soc. Biol. 142: 15—16.
- Czosnowski J., 1948, Bull. Soc. Amis Sc. et Lettr de Poznań, IX, 138—142.
- Czosnowski J., 1952, Bull. Soc. Amis Sc. et Lettr de Poznań, XIII, Nr 4.
- Gautheret R. J., 1946, C. R. Soc. Biol. 140: 169—171.
- Gautheret R. J., 1947, C. R. Acad. Sci., 224: 1728—1730.
- Gautheret R. J., 1948, C. R. Ac. Sci. 226: 270—271.
- Holden M., 1952, Biochem. J., 51: 433.
- Holden M., Pirie N. W., 1955, Biochem. J., 60: 53.
- Klein R. M., Rush E. M., Swift H., 1953, Cancer Research, 13: 499.
- Kraus E. J., Brown N. A., Hammer K. C., 1936, Bot. Gaz., 98: 370—420.
- Levine M., Chargaff E., 1937, Amer. J. Bot. 24: 461—472.
- Link G. K. K., Wilcox H. W., Link A. D., 1937, Bot. Gaz. 98: 816—867.
- Ropp de R. S., 1947, Amer. J. Bot., 34: 53—62.
- Ropp de R. S., 1950, Amer. J. Bot., 1950, 37: 352—363.