Aktywność pektyno-metylo-esterazy w tkankach tumorowej i normalnej *Nicotiana tabacum* hodowanych *in vitro*

Pectin-methyl-esterase in normal and tumor tissues of Nicotiana tabacum

H. ŁUKASIAK, A. RENNERT

Z zagadnieniami przemian cukrowców u roślin wiąże się ściśle problem metabolizmu ścian komórkowych. Dlatego też enzymy biorące udział w tym metabolizmie znajdują się obecnie w centrum uwagi wielu badaczy (Cleland 1963; Deuel, Stulz 1958; Feigold, Neufeld, Hassid 1958; Fray-Wyssling 1955; 1959; Husain, and Kelman 1959; Kiwilaan, Beaman and Bandurski 1959; Setterfield and Bayley 1958; Smith 1958; Whistler and Smart 1953).

W poprzedniej naszej pracy na temat pektyno-metylo-esterazy (PME) w roślinach *Datura stramonium* wykazana została wyższa aktywność tego enzymu w tumorach aniżeli w łodygach roślin zdrowych (Łukasiak 1963).

Biorąc pod uwagę dużą zależność aktywności enzymów od warunków zewnętrznych (dla pektyno-esteraz wykazali to Rouse, Atkins i Moore (Rouse, Atkins and Moore 1962) wydawało się celowe prowadzenie dalszych naszych badań w warunkach możliwie standardowych, które zapewnia hodowla tkanek *in vitro*.

MATERIAŁ I METODA

Do badań nad aktywnością PME posłużyły szczepy tkanek tumora bakteryjnego i normalnej *Nicotiana tabacum* var. White Burley, utrzymywane w hodowli *in vitro* przez kilka lat (Rennert 1965) w stałych warunkach zewnętrznych (temperatura, wilgotność, oświetlenie). Szczepy rosły na zmodyfikowanym podłożu syntetycznym White'a oraz na podłożu wzbogaconym wyciągiem z pyłku pszczelego (Rennert, Gubański 1962).

Klony przeznaczone do badań oczyszczano dokładnie z resztek podłoża za pomocą bibuły. Z kilku kolonii sporządzano 2-gramowe odważki, które następnie rozcierano w moździerzu z dodatkiem małej ilości kwarcu w buforze fosforanowym o pH 7. Homogenaty uzupełniano tym samym buforem uzyskując odpowiednie rozcieńczenie. Jako substrat stosowano 2% roztwór pektyny wyizolowanej w naszej pracowni (Łukasiak 1963).

Oznaczenia aktywności enzymu dokonywano metodą opisaną przez Glasziou (1958). 1 ml homogenatu, lub ekstraktu po odwirowaniu przenoszono do bocznego naczynka aparatu Warburga, natomiast do głównego naczynka wprowadzano 1 ml 1% węglańu sodu oraz 2 ml substratu o pH 4,8—4,9. Całość umieszczano w łaźni wodnej o temp. 25°

Ryc. 1. Porównanie aktywności PME tkanek: normalnej oraz tumorowej *N. tabacum*
1 — tkanka normalna na podłożu standartowym; 2 — tkanka normalna na podłożu wzbogaconym; 3 — tkanka tumorowa na podłożu standartowym; 4 — tkanka tumorowa na podłożu wzbogaconym

Comparison of PME activities in normal and tumor tissues of *N. tabacum*

1 — normal tissue on standard medium; 2 — normal tissue on supplemented medium; 3 — tumor tissue on standard medium; 4 — tumor tissue on supplemented medium

i ostrożnie mieszano. Po upływie 15 minut roztwór enzymu z naczynka bocznego przelewano do substratu w naczynku głównym. Pomiarów ilości wydzielonego w reakcji CO_2 dokonywano w różnych odstępach czasu. Wykonano 5 serii pomiarów w 5-tygodniowych odstępach czasu. Każdy wynik w pojedynczej serii stanowił średnią 6 powtórzeń. Porównywano aktywność enzymu w tkance normalnej i tumorowej, przy czym każdą z tkanek hodowano na dwu różnych podłożach.

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wykresu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYKUSJA

Otrzymane wyniki świadczą wbrew naszym oczekiwaniom o wyższej aktywności PME w tkance zdrowej w porównaniu z tkanką tumorową. W poprzednich badaniach nad *D. stramonium* (Łukasiak 1963) zależność ta była odwrotna. Niniejsze wyniki dotyczą jednak materiału

z dwu różnych gatunków roślin oraz z dwu różnych hodowli: *in vivo* i *in vitro*. Należy również podkreślić, że w przeciwieństwie do badanych poprzednio tumorów z *D. stramonium*, obecnie badana tkanka tumorowa tytoniu nie zawierała bakterii (Rennert 1965). W niniejszych rozważaniach fakt ten uznano jednak za nieistotny, ponieważ z wstępnych naszych badań (materiały nie publikowane) wynikało, że aktywność PME w tumorach pierwotnych (zawierających bakterie) i wtórnych (bezbakteryjnych) u *D. stramonium* jest identyczna.

Rouse, Atkins i Moore (1962) wykazali, że aktywność pektyno-esteraz oraz zawartość związków pektynowych mogą być różne nawet dla tych samych odmian jednego gatunku w tych samych stadiach rozwojowych, lecz w dwu różnych sezonach. Aktywność PME może również zależeć od stopnia estryfikacji związków pektynowych w danym materiale biologicznym oraz od występowania dostatecznej ilości metioniny będącej głównym dostarczycielem grup metylowych (Cleland 1963). Możliwe, że tkanka tumorowa odcięta od swego naturalnego podłoża (tkanki rośliny-gospodarza) nie jest zdolna do wytwarzania wystarczającej ilości metioniny, co mogłoby mieć ujemny wpływ na aktywność PME. Pozorna zatem sprzeczność uzyskanych wyników wydaje się być uzasadniona.

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano ciekawą zależność aktywności PME od podłoża, na którym rosły tkanki. W przypadku tkanki tumorowej aktywność PME była stymulowana przez dodatek ekstraktu z pyłku pszczelego (pierzga), natomiast w tkance zdrowej uzyskano hamowanie aktywności enzymu przez ten sam ekstrakt. Fakt ten może wiązać się z działaniem niejednakowych stężeń czynników wzrostowych w badanych szczepach. Tkanekę normalną hodowano na podłożu zawierającym kwas β -indolooctowy, kinetynę oraz adeninę. Podłoże dla tkanki tumorowej nie zawierało tych składników, gdyż tumory wytwarzają substancje wzrostowe w trakcie własnej przemiany materii. Prawdopodobnie wraz z pyłkiem pszczelim zostały wprowadzone do podłoża dodatkowe czynniki o charakterze stymulatorów wzrostu (Rennert 1965). Zbyt duże ich stężenie (tkanka normalna) mogło spowodować obniżenie aktywności PME. Jak wykazali Ordin (1955) i Jansen (1960) auksyny wpływają na przyspieszenie metylacji pektyn.

Dalsze badania nad składem i własnościami pyłku pszczelego, jak i działaniem jego frakcji na wzrost tkanek mogą mieć decydujące znaczenie w rozstrzygnięciu tej kwestii.

STRESZCZENIE

Porównywano aktywność pektyno-metylo-esterazy (PME) w tkankach tumora bakteryjnego i normalnej *Nicotiana tabacum* hodowanych *in vitro*. Tkanka normalna na podłożu standartowym wykazywała wyższą aktywność PME. Na podłożu wzbogaconym wyciągiem z pyłku pszczelego obserwowano hamowanie aktywności tego enzymu w tkance normalnej oraz stymulację w tkance tumora bakteryjnego. Fakt ten wiąże się prawdopodobnie z działaniem zbyt dużego stężenia substancji wzrostowych w podłożu dla tkanki normalnej.

SUMMARY

The activities of pectin-methyl-esterase (PME) in crown gall tumor and normal tissues of *Nicotiana tabacum* cultured *in vitro* were compared. The normal tissue showed the higher activity of this enzyme when grown on the standard medium. On the medium supplemented with bee bread extract the higher activity of PME was observed in tumor tissue. In normal tissue however the inhibition of PME activity took place. This fact is probably connected with too high concentration of growth substances in the culture medium of normal tissue.

LITERATURA

- Cleland R., 1963, *Plant. Physiol.* 38 (1) 13—18.
 Deuel H. and Stulz E., 1958, *Adv. Enzymol.* 20:341.
 Feigold D. S., Neufeld E. F., and Hassid W. Z., 1958, *Arch. of Bioch. Biophys.* 78:401—406.
 Fray-Wyssling A., 1955, *Biochim. et Biophys. Acta* 18:166—68.
 Fray-Wyssling A., 1959, *Pflanzliche Zellwand* (Spring-Verlag, Berlin, Germany, 367.
 Husain A., and Kelman A., 1959, *In Plant Pathology, An Advanced Treatise* 1. Academic Press, New York p. 143—188.
 Glasziou K. T., 1958, *Austral. J. Biol. Sci.* 11:127.
 Jansen E. F., Rosie Jang. Albersheim P. and Bonner J., 1960, *Plant Physiol.* 35:87—97.
 Kiwilaan A., Beaman T. C. and Bandurski R. S., 1959, *Nature* 184:81—82.
 Łukasiak H., 1963, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 32(3):505—510.
 Ordin L., Cleland R., and Bonner J., 1955, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 41:1023—1029.
 Rennert A., Gubański M., 1962, *Acta Soc. Bot. Polon.*, XXXI, 3, 545—552.
 Rennert A., 1965, *Zeszyty Uniwersytetu Łódzkiego*, 1.
 Rouse A. H., Atkins C. D. and Moore E. L., 1962, *Reprinted from Journal of Food Science (formerly Food Research)* 27, 5, 419—25.
 Setterfield G. and Bayley S. T., 1958, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 377—385.
 Smith W. K., 1958, *J. Gen. Mikrobiol.* 18, 33—41.
 Whistler R. L. and Smart Ch. L., 1953, *Polisacharide Chemistry* Chapt., 7, Academic Press, New York.