

Alicja Karwowska, Joanna Filon, Ewa Grzegorzczuk, Jan Karczewski

AKTYWNOŚĆ PEPTYDAZOWA I HAMOWANIE AKTYWNOŚCI KATEPSYNY D PRZEZ EKSTRAKT Z NASION SOCZEWICY

Zakład Higieny i Epidemiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik prof. dr hab. *J. Karczewski*

Określono aktywność peptydazową i hamowanie aktywności katepsyny D przez ekstrakt z nasion oraz łupin i bielma soczewicy.

Hasła kluczowe: nasiona soczewicy, aktywność peptydazowa, hamowanie aktywności katepsyny D.

Key words: lentil seeds, proteolytic activity, impeding activity of cathepsin D.

Nasiona roślin zawierają peptydazy serylowe, cysteinyłowe, aspartyłowe i metaloproteinazy oraz ich peptydowe/poliipeptydowe inhibitory (1- 3). Dotychczas nie w pełni poznano zarówno ich wzajemne oddziaływanie jak i ich interakcje z egzogennymi peptydazami oraz egzogennymi inhibitorami peptydaz (4, 5).

W fazie spoczynkowej peptydazy i ich inhibitory występują w różnych strukturach anatomicznych i subkomórkowych nasion i nie kontaktują się ze sobą (6, 7). Inhibitory zabezpieczają białka zapasowe nasion przed degradacją proteolityczną w fazie spoczynkowej. Chronią one ponadto białka nasion przed działaniem proteinaz saprofitycznych wirusów, bakterii, pleśni i owadów (8-10). Peptydazy uaktywniają się w czasie kiełkowania nasion, trawią białka zapasowe i dostarczają aminokwasów rozwijającej się roślinie (7, 11).

Celem pracy jest ocena aktywności peptydazowej i hamowania aktywności katepsyny D przez ekstrakt z nasion oraz łupiny i bielma soczewicy.

MATERIAŁ I METODY

Globina wołu otrzymana metodą *Marciniszyna* i współpr. (12); katepsyna D z wątroby wołu i odczynnik Bradforda firmy Sigma, odczynnik *Folina* i *Cioalteau* i kwas trichlorooctowy (TCA) firmy Merck, odczynnik miedziowy o składzie: 1 objętość 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ w 1% cytrynianie sodu $\times 5 \text{H}_2\text{O}$ i 30 objętości 10% Na_2CO_3 ; bufor *Brittona* i *Robinsona* o pH 3,5.

Całe nasiona soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*) oraz łupinę i bielmo rozdrabniano w młynku mechanicznym i ekstrahowano 0,15 mol/l NaCl w stosunku 1:9 w/v w ciągu 2 godzin, ciągle mieszając. Płyn nadosadowy otrzymany przez wirowanie (1500 x g, 4°C, 30 minut) użyto do badań. Wartość pH mierzono przy użyciu pehametru Lab 850 Schott Instruments. Białko oznaczano metodą *Bradforda* (13).

W celu określenia aktywności peptydazowej do 0,4 ml ekstraktu z nasion, łupiny i bielma dodawano 0,1 ml 6% globiny i inkubowano 6 godzin w temperaturze 37°C. Wszystkie odczynniki posiadały pH 3,5. Reakcję przerywano przez dodanie 0,1 ml 10% TCA. Próby wytrącone w czasie zero stanowiły kontrolę. W otrzymanym przez wirowanie płynie nadosadowym oznaczono ilość uwolnionej tyrozyny za pomocą odczynnika miedziowego i odczynnika *Folina* i *Ciocalteau* (14).

W celu określenia aktywności inhibitorowej do 0,3 ml 2,5 µg/ml katepsyny D dodawano 0,1 ml ekstraktu z nasion, łupiny lub bielma (w kontroli 0,1 ml buforu), preinkubowano 30 minut w temperaturze 37°C, dodawano 0,1 ml globiny i inkubowano 6 godzin w tej samej temperaturze. Wszystkie odczynniki posiadały pH 3,5. Dalej postępowano jak przy oznaczaniu aktywności peptydazowej ekstraktów. Aktywność katepsyny D była tak dobrana, aby absorbancja produktów degradacji globiny mierzona przy 750 nm, w teście bez ekstraktu, wynosiła około 0,50. Aktywność tą przyjęto za 100%. Z obniżenia ilości uwolnionej tyrozyny w teście z ekstraktem wnioskowano o stopniu inhibicji katepsyny D (14).

Oznaczenia wykonano w sześciu oddzielnych próbkach ekstraktu z nasion, łupin i bielma, a uzyskane wartości średnie zamieszczono w tabeli I.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zarówno ekstrakt z całych nasion jak i ekstrakt z łupiny i ekstrakt z bielma wykazuje słabo kwasowe pH (tab.I). Zawartość białka w ekstrakcie z całych nasion soczewicy wynosi średnio 1,0 mg/ml, z czego na ekstrakt z łupiny przypada 18%, a na ekstrakt z bielma 78%. Aktywność peptydazowa mierzona w pH 3,5 ekstraktu z całych nasion wynosi 310,8 Tyr nmol/ml/6 h. W ekstrakcie z łupiny lokalizuje się 64,6%, a w ekstrakcie z bielma 35,8% tej aktywności. Ekstrakt z całych nasion soczewicy hamuje 27,9% aktywności katepsyny D, a ekstrakt z łupiny i bielma odpowiednio 23,1 i 4,1%.

Wyniki oznaczania aktywności proteolitycznej i inhibitorowej (antyproteolitycznej) występujących w zhomogenizowanym materiale w mieszaninie wymagają szczegółowej interpretacji. Powody trudności w tym względzie stanowi możliwość (6, 15-17): 1 – hamowanie aktywności proteiny przez inhibitor, lub degradacji i inaktywacji inhibitora przez proteinę; 2 – hamowanie aktywności proteiny egzogennej w wyniku inaktywacji przez proteinę endogenną lub przez endogeny inhibitor.

Spośród nasion 14 gatunków roślin spożywanych przez człowieka wykazujących aktywność proteolityczną w pH 3,5, tylko nasiona soczewicy zawierają substancję obniżającą aktywność katepsyny D (18). Substancja ta jest termostabilna (19). Nie jest nią więc proteaza działająca w kwasowym pH. Wskazuje to na drobnocząsteczkowy niepeptydowy charakter tej substancji. Być może są nią związki polifenolowe, które inaktywują niespecyficznie wiele proteinaz (20). Może nią być pepstatyna, wytwarzana przez saprofitujące na łupinach soczewicy bakterie z rodziny *Streptomyces*.

Tabela 1. Wartość pH, zawartość białka, aktywność proteolityczna i inhibitor ketapsyny D nasion soczewicy.

Table 1. pH, protein content, proteolytic activity and lentil seeds inhibitor of cathepsin D.

| Oznaczenie | Nasiona soczewicy | | |
|--|-------------------|--------------|--------------|
| | Cale | Łupina | Bielmo |
| Masa (%) | 100 | 8,9 | 91,1 |
| pH ^x | 5,60 | 5,10 | 5,70 |
| Białko, mg/ml (%) | 1,0 (100,0) | 0,18 (18%) | 0,78 (78%) |
| Aktywność proteinazowa (pH 3,5), Tyr nmol/ml/6h (%) | 310,8 (100,0) | 200,8 (64,6) | 111,2 (35,8) |
| Hamowanie aktywności ketapsyny D, Tyr nmol/ml/6h (%) ^{xx} | 340,4 (27,9) | 363,2 (23,1) | 452,8 (4,1) |

^x – pH użytego do ekstrakcji 0,15 mol/l NaCl wynosiło 6,50;^{xx} – aktywność ketapsyny D w teście bez inhibitora wynosiła 472,0 Tyr nmol/ml/6h; aktywność tą przyjęto za 100%.

Dotychczasowe wyniki badań pozwalają stwierdzić jedynie, że w nasionach soczewicy występują substancje hamujące/inaktywujące proteinazy (pepsyna, trypsyna i chymotrypsyna) (4, 19). Nie wiadomo jednak, czy są to polipeptydowe inhibitory monowalentne/poliwalentne, czy też niespecyficzne inaktywatory o strukturze polifenoli.

WNIOSKI

1. Ekstrakt z nasion oraz łupin i bielma nasion soczewicy wykazuje aktywność proteolityczną w pH 3,5 i obniża aktywność ketapsyny D.
2. Substancja występująca w nasionach soczewicy obniżająca aktywność ketapsyny D wymaga identyfikacji.

A. Karwowska, J. Fiłon, E. Grzegorzczuk, J. Karczewski

PEPTIDASE ACTIVITY AND IMPEDING CATHEPSIN D ACTIVITY BY LENTIL SEED EXTRACT

Summary

Plant seeds contain seryl, cysteinyl, aspartyl peptidase and metalloproteinase as well as their polypeptide inhibitors. Their influence on each other and their interaction with egzogenic peptidase and egzogenic peptidase inhibitors have not been fully discovered so far.

The aim of this study was to determine peptidase activity and cathepsin D activity impedance by extracts from whole seeds, the hull layer and the endosperm of lentils. Globin was a substrate for proteinase, while the amount of tirozin, which is both released from globulin and soluble in trichloroacetic acid, was a measurement factor of enzymatic activity.

The extract from lentil seeds, hull layer and endosperm shows proteinase activity in pH 3.5 and impedes the activity of cathepsin D. The activity is determined in the extract from hull layer at 64.6% and in the extract from endosperm at 35.8%. The extract from the whole lentil seeds impedes 27.9% of

cathepsin D activity, while extract from the hull layer and the endosperm impedes 23.1% and 4.1% of cathepsin D activity respectively.

PIŚMIENNICTWO

1. *Laskowski M., Kato I.*: Protein inhibitors of proteases. *Ann. Rev. Biochem.*, 1980; 49: 593-626. -2. *Ryan C. A., Walker-Simmons M.*: Plant proteinases, w: *The biochemistry of plants*, red. A. Marcus. Acad. Press, New York, 1981; Vol. 6: 321-350. -3. *Simoës I., Faro C.*: Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 2004; 271: 2067-2075. -4. *Bañkowska A., Roszkowska-Jakimiec W., Worowski K.*: Inhibitor of pepsin, trypsin and chymotrypsin in seeds of plants consumed by human and animals. *Rocz. Ak. Med. Białystok.*, 1998; 43: 278-286. -5. *Bode W., Huber R.*: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 1992; 204: 433-451. -6. *Callis J.*: Regulation of protein degradation in plants. *Genet. Eng.*, 1997; 19: 121-148. -7. *Golaszewski T., Siwecka M. A., Szarkowski J. W.*: Podstawowe procesy biochemiczne podczas kiełkowania nasion. *Post. Bioch.*, 1972; 18: 125-137. -8. *Koiwa H., Bressan R. A., Hasegawa P. M.*: Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.*, 1997; 2: 379-384. -9. *Ryan C. A.*: Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Ann. Rev. Physiol.*, 1990; 28: 425-449. -10. *Shewry P. R., Lucaf J. A.*: Plant proteins the confer resistance to pests and pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 1997; 26: 135-192.
11. *Viersta R. D.*: Protein degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1993; 44: 385-410. -12. *Marciniszyn J., Hartsuck J. A., Tang J.*: Mode of inhibition acid protease by pepstatin. *J. Biol. Chem.*, 1976; 251: 7088-7094. -13. *Bradford M. M.*: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254. -14. *Minarowska A., Karwowska A., Gacko M.*: Quantitative determination and localization of Cathepsin D and its inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2009, 47, 153-177. -15. *Gacko M., Minarowska A., Karwowska A., Minarowski L.*: Cathepsin D inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2007; 45: 291-313. -16. *Lenarcic B., Kos J., Dolenc I., Lucownik P., Krizaj I., Turk V.*: Cathepsin D inactivates cysteine proteinase inhibitors cystatins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 154: 765-772. -17. *Pimenta D. C., Chen V. C., Chao J., Juliano M. A., Juliano L.*: α_1 -antychymotrypsin and kallistatin hydrolysis by human cathepsin D. *J. Prot. Chem.*, 2000; 19: 411-418. -18. *Karwowska A., Gacko M., Worowska A.*: Hamowanie aktywności pepsyny i aktywności katepsyny D przez ekstrakty z nasion roślin spożywanych przez człowieka. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41: 258-261. -19. *Chlabicz M., Gacko M., Guzowski A., Krupkowska A., Bañkowska A.*: Termostabilność roślinnych inhibitorów proteaz przewodu pokarmowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37(supl.): 337-339. -20. *Dell'Agli M., Canavesi M., Galli G., Bellota S.*: Dietary polyphenols and regulation of gelatinase expression and activity. *Thrombos. Haemostas.*, 2005; 93: 751-760.

Adres: 15-089 Białystok, ul. Mickiewicza 2C.