Antyproteolityczna aktywność białek nasion wiechliny łąkowej i tymotki łąkowej

Antiproteolytic activity of proteins from Poa pratensis and Phleum pratense seeds

W. MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, I. LORENC-KUBIS

Metoda taniinowa dzięki swojej czułości oraz małej swoistości w strącaniu białek i polipeptydów o masie cząsteczkowej wyższej od 3 tysięcy znalazła zastosowanie do badania przebiegu proteolizy w postępowaniu opracowanym przez Mejbaum-Katzenellenbogen, Wilusza i Polanowskiego (1966). W metodzie tej przebieg proteolizy można śledzić dwoma testami — peptydowym i polipeptydowym. Test peptydowy polega na oznaczaniu substratu reagującego z taniną, test polipeptydowy — na selektywnym oznaczaniu polipeptydowych produktów reakcji reagujących z taniną i przechodzących do przesączu kwasu sulfosalicylowego lub tróchlorooctowego. Metoda ta została również wykorzystana do oznaczania aktywności inhibitorowej zarówno w materiale zwierzęcym, jak i roślinnym (Wilimowska-Pelc, Mejbaum-Katzenellenbogen 1969; Wilusz 1968; Polanowski 1967; Lorenc-Kubis 1969; Mejbaum-Katzenellenbogen, Marciniak 1969).

Lorenc-Kubis (1969) wykazała obecność inhibitorów trypsynowych w nasionach różnych gatunków traw.

Celem tej pracy było bliższe określenie aktywności antyproteolitycznej białek nasion wiechliny łąkowej i tymotki łąkowej.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzano na nasionach 2 gatunków traw — wiechlinie łąkowej (*Poa pratensis*) i tymotce łąkowej (*Phleum pratense*) ze zbiorów 1966, 1967 i 1968 roku pochodzących z Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin we Wrocławiu. Nasiona przechowywano przy wilgotności względnej powietrza od 45 do 55 %. Siła kiełkowania analizowanych odmian wynosiła 89 do 98 %.

Ekstrakcję białek z nasion 0,9% roztworem chlorku sodu przeprowadzano analogicznie jak w poprzedniej pracy (Lorenc-Kubis 1969).

Aktywność proteolityczną i inhibitorową oznaczano w teście peptydowym i polipeptydowym wg Mejbaum-Katzenellenbogen i współpracowników (1966).

Odczynniki:

Trypsyna firmy Merck A. G. Darmstadt o aktywności 20 000 jednostek Fulda-Grossa na gram,

Trypsyna krystaliczna otrzymana z trzutek bydłych metodą Northropa i Kunitza (1931). W dwukrotnie krystalizowanych preparatach nie stwierdzono aktywności chymotrypsynowej wobec TEE.

Chymotrypsyna 2 razy krystalizowana firmy Reanal.

Kazeina biała rozpuszczalna firmy British Drug House Poole, England.

Tanina oczyszczona poprzez ekstrakcję do octanu etylu wg Armitage i współpracowników (1961). Pozostałe odczynniki były cz.d.a. i pochodziły z Polskich Odczynników Chemicznych — Gliwice.

WYNIKI

Na wykresie 1 przedstawiono przebieg trawienia kazeiny trypsyną Merck (zawierającą drobne ilości chymotrypsyny), w obecności i nieobecności białek wiechliny i tymotki, mierzony testem peptydowym. Stwierdzono wyraźny hamujący wpływ białek obu gatunków traw na degradację kazeiny do produktów nie oznaczających się taniną. Znaczne różnice wystąpiły natomiast w teście polipeptydowym (wykres 2).

Białka nasion wiechliny w początkowym etapie proteolizy nie hamowały aktywności trypsyny. Po 60 minutach występowało jednak wyraźne hamowanie, gdyż stężenie polipeptydów w przesączu kwasu sulfosalicylowego było dwukrotnie wyższe

Legenda do wykresów 1—4. — Legend for diagrams 1—4

- 1 Krzywa A bez inhibitora (curve A without the inhibitor)
 Krzywa B i C w obecności inhibitora z nasion: B — tymotki i C — wiechliny
 Curve B and C with the inhibitor from seeds of: B — *Phleum pratense* and C — *Poa pratensis*
 1 ml inkubatu zawierał 2,5 mg kazeiny rozpuszczonej w 0,1 M moderatorze fosforanowym o pH 7,6, 10 µg trypsyny i 100 µg białka wyciągu. Inkubacja w 30°. Reakcję przerywano 0,3 N HCl (test peptydowy), lub równą objętością 0,3 M kwasu sulfosalicylowego (test polipeptydowy). Wyniki podano w przeliczeniu na 1 ml inkubatu
 The incubation mixture contained in 1 ml: 2,5 mg of casein in 0,1 M phosphate buffer, pH 7,6, 10 µg of trypsin and 100 µg of seed extract protein. The incubation was carried out at 30°. The reaction was stopped by adding 0,3N HCl (peptide test) or 0,3 M sulphosalicylic acid (polypeptide test). The results are calculated per 1 ml of incubation mixture
- 2 Krzywa A bez inhibitora (curve A without the inhibitor)
 Krzywa B i C w obecności inhibitora z nasion: B — tymotki i C — wiechliny
 Curve B and C with the inhibitor from seeds of: B — *Phleum pratense* and C — *Poa pratensis*
 Warunki testu podano pod wykresem 1
 Details of the assay are given in figure 1
- 3 Krzywa A bez inhibitora (Curve A without the inhibitor)
 Krzywa B i C w obecności inhibitora z nasion: B — tymotki i C — wiechliny (curve B and C with the inhibitor from seeds of: B — *Phleum pratense* and C — *Poa pratensis*).
 1 ml inkubatu zawierał 2,5 mg kazeiny w 0,1 M moderatorze fosforanowym, pH 7,6, 5 µg trypsyny i 50 µg białek wyciągu. Warunki testu podano pod wykresem 1.
 The incubation mixture contained in 1 ml: 2,5 mg of casein in 0,1 M phosphate buffer pH 7,6, 5 µg of trypsin and 50 µg of seed extract protein. Details are given in figure 1.
- 4 Krzywa A — bez inhibitora (Curve A without the inhibitor)
 Krzywe B i C w obecności inhibitora z nasion: B — tymotki i C — wiechliny (Curves B and C with the inhibitor from seeds of: B — *Phleum pratense* and C — *Poa pratensis*)
 Warunki testu podano pod wykresem 1. (Details are given in figure 1.)

1

2

Wykres 1. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną firmy Meck w obecności i nieobecności białek wyciągu chlorkowego z nasion wiechliny łąkowej i tymotki łąkowej. Test peptydowy
Time course of casein degradation by trypsin Merck in the presence or absence of proteins from *Poa pratensis* and *Phleum pratense* seeds. Peptide test

Wykres 2. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną firmy Merck w obecności i nieobecności białek wyciągu chlorkowego z nasion wiechliny łąkowej i tymotki łąkowej. Test polipeptydowy
Time-course of casein degradation by trypsin Merck in presence or absence of protein from *Poa pratensis* and *Phleum pratense* seeds. Polipeptide test

3

4

Wykres 3. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną krystaliczną w obecności i nieobecności białek wyciągu chlorkowego z nasion tymotki łąkowej i wiechliny łąkowej. Test peptydowy
Time-course of casein degradation by crystalline trypsin in the presence or absence of proteins from *Phleum pratense* and *Poa pratensis* seeds. Peptide test

Wykres 4. Przebieg proteolizy kazeiny trypsyną krystaliczną w obecności i nieobecności białek wyciągu chlorkowego z nasion tymotki łąkowej i wiechliny łąkowej. Test polipeptydowy
Time-course of casein degradation by crystalline trypsin in the presence or absence of proteins from *Phleum pratense* and *Poa pratensis* seeds. Polipeptide test

5

Wykres 5. Trawienie kazeiny chymotrypsyną w obecności i nieobecności białek wyciągu chlorowego z nasion wiechliny łąkowej i tymotki łąkowej. Test peptydowy
 Digestion of casein by chymotrypsin in the presence or absence of proteins from *Poa pratensis* and *Phleum pratense* seeds. Peptide test

6

7

Wykres 6. Hamowanie aktywności proteolitycznej chymotrypsyny przez białka nasion wiechliny łąkowej.

Inhibition of proteolytic activity of chymotrypsin by proteins from *Poa pratensis* seeds

Wykres 7. Hamowanie aktywności proteolitycznej trypsyny krystalicznej przez białka nasion wiechliny łąkowej.

Inhibition of proteolytic activity of crystalline trypsin by proteins from *Poa pratensis* seeds

niż w próbie bez inhibitora. W obecności białek nasion tymotki hamowanie występowało od początku reakcji. Krzywa przebiegu proteolizy była więc przesunięta w stosunku do krzywej ilustrującej przyrost polipeptydów w nieobecności inhibitora.

Doświadczenia powtórzono na preparacie trypsyny krystalicznej nie zawierającej zanieczyszczeń chymotrypsyną (wykres 3 i 4). W teście polipeptydowym w obecności trypsyny krystalicznej następowało szybkie narastanie polipeptydowych produktów reakcji, po czym ilość powstałych polipeptydów utrzymywała się na tym samym poziomie. Dla białek obu gatunków traw stwierdzono aktywność antytrypsynową w teście peptydowym i polipeptydowym. W teście polipeptydowym białka tymotki i wiechliny wykazywały bardzo słabą aktywność antyproteolityczną.

Przebieg trawienia kazeiny chymotrypsyną w obecności białek nasion wiechliny i tymotki przedstawiono na wykresie 5.

Białka wiechliny bardzo silnie hamowały degradację kazeiny do produktów nie oznaczających się taniną. Znacznie słabszy efekt hamowania chymotrypsyny wykazywały białka nasion tymotki. W tym przypadku różnica między ubytkiem substratu w próbie bez inhibitora a próbą zawierającą białka nasion stanowiła zaledwie 10%, podczas gdy w przypadku białek wiechliny — 43%.

Na wykresie 6 i 7 przedstawiono wpływ wzrastających stężeń białek nasion wiechliny na degradację kazeiny chymotrypsyną i trypsyną. Całkowite hamowanie 1 μ g chymotrypsyny uzyskiwano dla białek nasion wiechliny przy stosunku enzymu: inhibitora równym 1:14, dla białek tymotki stosunek ten wynosił 1:55. Całkowite hamowanie aktywności 1 μ g trypsyny dawało 35 μ g białek wiechliny i 90 μ g białek tymotki.

DYSKUSJA

Stosowanie metody taninowej do badania proteolizy stwarza pewne możliwości odróżnienia powstających produktów proteolizy, a więc pośrednio może informować o charakterze i czystości enzymu. Krzywa polipeptydowa pozwala odróżnić czysty preparat trypsyny od preparatu zanieczyszczonego drugim enzymem proteolitycznym.

Legenda do wykresów 5–7, — Legend for diagrams 5–7

- 5 Krzywa A bez inhibitora (Curve A without the inhibitor)
Krzywe B i C w obecności inhibitora z nasion: B — tymotki i C — wiechliny (curves B and C with the inhibitor from seeds: of: B — *Phleum pratense* and C — *Poa pratensis*)
1 ml inkubatu zawierał 2,5 mg kazeiny rozpuszczonej w 0,1 M moderatorze fosforanowym o pH 7,6, 5 μ g chymotrypsyny i 50 μ g białka wyciągu.
The incubation mixture contained in 1 ml: 2,5 mg of casein in 0,1 M phosphate buffer pH 7,6, 5 μ g of chymotrypsin and 50 μ g of seed extract protein
- 6 1 ml inkubatu zawierał 2,5 mg kazeiny, 5 μ g chymotrypsyny i od 0 do 80 μ g białek nasion wiechliny łąkowej. Inkubację prowadzono w 30° przez 5 minut w pH 7,6
1 ml incubation mixture contained 2,5 mg of casein, 5 μ g of chymotrypsin and 0 to 80 μ g of protein from *Poa pratensis* seeds. Incubation was carried out at 30° for 5 min. pH 7,6
- 7 1 ml inkubatu zawierał 2,5 mg kazeiny, 5 μ g trypsyny i od 0 do 200 μ g białek nasion wiechliny łąkowej. Temperatura inkubacji 30°, pH 7,6
1 ml incubation mixture contained 2,5 mg of casein, 5 μ g of trypsin and 0 to 200 μ g of protein from *Poa pratensis* seeds. Incubation was carried out at 30° for 5 min. pH 7,6

Stosowana w poprzedniej pracy (Lorenc-Kubis 1969) do badań aktywności antytrypsynowej białek nasion traw trypsyna Merck była, jak później stwierdzono, zanieczyszczona chymotrypsyną. Z tych względów zajęto się szczegółowym przeanalizowaniem przebiegu proteolizy kazeiny trypsyną zarówno Merck, jak i krystaliczną nie zawierającą zanieczyszczeń chymotrypsyną.

Przebieg krzywych ilustrujących przyrost polipeptydowych produktów trawienia kazeiny tymi enzymami pozwolił na zróżnicowanie aktywności antyproteolitycznej białek nasion dwóch gatunków traw — tymotki i wiechliny na aktywność antytrypsynową i antychymotrypsynową. Okazało się, że białka obu gatunków podobnie jak białka nasion jęczmienia (Mejbaum-Katzenellenbogen, Marciniak 1969) wykazują aktywność zarówno antytrypsynową, jak i antychymotrypsynową. Białka nasion wiechliny różnią się istotnie od białek tymotki, gdyż silniej hamują chymotrypsynę niż trypsynę, podczas gdy białka nasion tymotki słabo hamują oba enzymy. Przewaga aktywności antychymotrypsynowej w białkach nasion wiechliny tłumaczy charakterystyczny przebieg krzywej polipeptydowej uzyskanej przy trawieniu kazeiny trypsyną zanieczyszczoną drobnymi ilościami chymotrypsyny. W pierwszym etapie proteolizy słabo hamowana trypsyna trawiła kazeinę do polipeptydowych produktów, w dalszym etapie skutkiem zahamowania aktywności chymotrypsynowej powstałe polipeptydy nie ulegały wtórnej degradacji do produktów nieoznaczających się taniną. Większość inhibitorów enzymów proteolitycznych obok aktywności antytrypsynowej wykazuje słabą aktywność antychymotrypsynową. Białka nasion wiechliny stanowią więc pewien wyjątek, gdyż zawierają głównie inhibitor o aktywności antychymotrypsynowej i słaby inhibitor trypsynowy.

Katedra Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego
Wrocław, ul. Szewska 38

(Wpłynęło dn. 8.5.1969 r.)

SUMMARY

In proteins from seeds of *Poa pratensis* and *Phleum pratense* anti-trypsin and anti-chymotrypsin activities were found.

The digestion of casein by trypsin and chymotrypsin in the presence or absence of proteins from these seeds was studied. It was found that proteins from *Poa pratensis* seeds showed a higher anti-chymotrypsin than anti-trypsin activity.

LITERATURA

- Armitage R., Bayliss G.S., Gramshaw J.W., Haslam E., Haworth R.D., Jones K., Rogers H.J., Searle T. 1961, J. Chem. Soc. 3: 1842.
- Lorenc-Kubis I., 1969, Acta Soc. Bot. Pol. 1: 165.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Marciniak H., 1969, Acta Soc. Bot. Pol. 38: 535.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W., Wilusz T., Polanowski A., 1966, Acta Biochim. Polon. 13: 87.
- Northrop J.H., Kunitz M., 1931, Science 73: 262.
- Northrop J.H., Kunitz M., 1932, J. Gen. Physiol 16: 267 cyt. przez Laskowskiego M. Metods in Enzymology (Colowick S.P and Kaplan N.O., 2, 26 1955 Academic Press New York)
- Polanowski A., 1967 Acta Biochim. Polon. 14: 389.
- Wilimowska-Pelc A., Mejbaum-Katzenellenbogen W., 1969 Acta Polon. Pharm. (praca w druku).
- Wilusz T., 1968 Acta Polon. Pharm. 25, 195.