

CZU: 577.112 : 581.48 : 582.843

ALERGENUL ARA H3, GLOBULINA DE REZERVĂ 11S**DIN SEMINȚELE DE ARAHIDE****1. PROTEOLIZA LIMITATĂ CU PAPAİNĂ***Ala CHERDIVARĂ, Angela RUDACOVA,
Serghei RUDACOV, Andrei ȘUTOV**Universitatea de Stat din Moldova*

Proteoliza globulinei de rezervă 11S din semințele de arahide, Ara h3, cu papaină începe cu cuscindarea secvenței C-terminale extinse a α -catenelor, care cuprinde regiunea α -helixurilor. Clivarea ulterioară a buclei dintre β -strendurile E' și F' din partea centrală a β -barrelui din α -catene duce la formarea fragmentelor, legate cu β -catenele intacte prin legătură disulfidică, precum și reținute în molecula globulinei 11S parțial hidrolizată prin interacțiuni necovalente. Conform scenariului proteolizei descrise, acțiunea inițială a papainei distruge regiunea C-terminală a α -catenelor, în care sunt prezenți trei din cei patru determinanți antigenici (epitopii IgE), identificați în globulina 11S din arahide. Astfel, gradul de alergenitate a Ara h3 poate fi substanțial redus prin proteoliza sa limitată cu papaină.

Cuvinte-cheie: globulinele 11S din semințe, alergeni, epitopii IgE, proteoliză, papaină, arahide.

ALLERGEN ARA H3, STORAGE 11S GLOBULIN FROM PEANUT SEEDS**1. PAPAİN LIMITED PROTEOLYSIS**

Papain proteolysis of the storage 11S globulin Ara h3 from peanut seeds starts from the detachment of an extended α -chain C-terminal sequence covering the region of α -helices. Further cleavage of a loop between β -strands E' and F' inside the central part of α -chain β -barrel occurs generating fragments connected with intact β -chains via a disulfide bond and those retained inside the molecule of partially hydrolyzed 11S globulin due to non-covalent interactions. In accordance with the described proteolysis scenario, the C-terminal α -chain region containing three of the four antigen determinants (IgE epitopes) identified in the peanut 11S globulin is destroyed during the initial papain action. Therefore, the level of Ara h3 allergenicity can be decreased via papain limited proteolysis.

Keywords: seed 11S globulins, allergens, IgE epitopes, proteolysis, papain, peanut.

Conform datelor prezentate în SDAP (Structural Database of Allergenic) [1], globulinele de rezervă 11S din semințele a 12 plante, inclusiv din soia și arahide, sunt alergeni [2]. Unii determinanți antigenici (epitopii IgE), identificați în globulina 11S de soia, glicinina [3, 4], aparțin zonei sensibile a moleculelor ei, care rapid se distruge la proteoliză inițială [5]. Aceasta demonstrează posibilitatea fundamentală de a reduce alergenicitatea glicininei din soia prin proteoliza sa limitată [2].

Glicinina din soia și globulina 11S din arahide, Ara h3, sunt similare după structura primară și terțiară. Cel puțin o parte din epitopii IgE identificați în glicinină [3, 4] și Ara h3 [6] aparțin regiunilor omoloage și structural echivalente ale moleculelor lor [7]. Prin urmare, este posibil ca proteoliza limitată nu doar a glicininei, dar și a Ara h3 să reducă nivelul alergenității ei. În acest context, în prezentul studiu am investigat proteoliza limitată a Ara h3 cu papaină.

Material și metode

Pentru a izola alergenul 11S, Ara h3, făina degresată din cotiledoanele de arahide (*Arachis hypogaea L.*) a fost extrasă cu tampon A (0,05M Tris-HCl, pH 8,0, 0,02% NaN₃, 1 mM EDTA). Ara h3 din extract a fost precipitată cu sulfat de amoniu (fracția 30-40% de saturație). Precipitatul se dizolvă în 3,0 M NaCl în tampon A, iar soluția a fost introdusă într-o coloană (2,6 x 9 cm) cu fenil-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech), echilibrată cu 3,0 M NaCl în tampon A. După îndepărtarea fracției neadsorbite, fracția Ara h3 a fost eluată cu 0,5 M NaCl în tampon A.

Ara h3 a fost hidrolizată cu papaină (Sigma Life Science) la 30°C. Amestecul de reacție a conținut 5 mg/ml substrat și fie 10 μ g/ml sau 5 μ g/ml enzimă în tampon B (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, ajustat prin adăugarea NaCl la tăria ionică de 0,5, conținând 0,02% NaN₃ și 1 mM EDTA). Reacția a fost stopată prin adăugarea acidului tricloracetic până la concentrația finală de 5%.

Produsele macromoleculare ale proteolizei au fost studiate prin SDS-PAGE (electroforeză în gel de poli-acrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu) în gel de 15%, în prezența și absența 2-mercaptoetanolului (ME), sistemul tampon Laemmli [8]. Am folosit markerii moleculari PageRuler Thermo Scientific (Lituania). Electroforetogrammele au fost scanate (ImageScanner III, GE Healthcare) și analizate utilizând software-ul Phoretix 1D Gel Analysis v.5.10.

Suprafața unui rest de aminoacid din structura proteinei accesibilă la solvent (ASA), exprimată în Å², a fost calculată folosind software-ul <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>. Valoarea relativă a ASA a fost exprimată în % de accesibilitate la solvent a restului X în tripeptida GXG. Analiza ASA a fost realizată utilizând structura model a hexamerului Ara h3 construită anterior (structura monomerului pdb|3c3v ca model) [2].

Rezultate și discuții

Subunitățile globulinei 11S din arahide constau din α - și β -catene, unite printr-o legătură disulfidică. Cele patru tipuri de subunități din componența moleculei hexamere a globulinei 11S din arahide (*a se vedea* Tabelul) diferă după masa moleculară, în principal a α -catenei. Masa moleculară a β -catenelor conservative variază ușor ($20.69 \pm 0,14$ kD).

Tabel

Masele moleculare (kD) a celor patru tipuri de subunități ale globulinei 11S din arahide

Numărul de acces	$\alpha\beta$ -subunitate	α -catene		
		secvența	media	SDS-PAGE
AAM46958	59.696	38.835	38.84	39.0
AAR02860	59.457	38.837		
AAD47382	58.849	37.929	37.80	37.8
ABF93402	58.574	37.921		
3c3v	58.485	37.963		
AAG01363	58.223	37.638		
ABL14270	58.214	37.570		
ADQ53859	56.284	35.614	35.61	35.6
AAU21492	52.513	31.973	31.97	32.3

Baza structurii terțiare a α - și β -catenelor subunităților Ara h3 din arahide (pdb/3c3v), tipică pentru globulinele 11S din semințe [7], o constituie β -barrelul din opt β -stenduri antiparalele (așa-numitul modul *cupin* [9]), legat cu un grup de α -helixuri (Fig.1). Secvența α -catenei conține trei regiuni nestructurate, care în structura model a hexamerului Ara h3 formează straturi de suprafață hidrofili [2] cu o accesibilitate sporită la solvent (Fig.2) și, prin urmare, potențial sensibile la atacul proteolitic. De remarcat că trei din cei patru epitopi IgE din Ara h3 sunt localizați în regiunea C-terminală a α -catenei, în afara β -barrelului [6] (Fig.1).

ISFRQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGY**IETWNPNNQEFECAG**VALSRLVLRNALRRPFY
Z **A'** **A** **h0** **B** **C**

SNAPQEIFIQOGRGYFGLIFPG**CPSTYEEPAQO**grryqsqrpprrlqeedqsqQQODSHQKVHRF
D **E** **E'** **1** **F'**

NEGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQFRRFNLAGNHEQEFRLRYQQqsrg
F **G** **H** **I** **J** **h1'**

srrrslpyspyspqsqrqeeerefsprgqhsrrreragqeeeh**egGNIFSGFTPEFLAQA**FQVDDR
2 **h1** **h2**

QIVQNLRGENESEEQGAI**VTVRGGLRILSPdrkr**gadeeeeey**dedeyeydeedrrrg**rgsrsgn
h3 **J'** **3**

Fig.1. Secvența de aminoacizi și structurile secundare ale α -catenei globulinei 11S din arahide (pdb/3c3v), formând β -barrelul din β -stendurile de bază antiparalele BCDE și FGHI, β -stendurile suplimentare (A', A, E', F', J, J' și Z) și α -helixuri (de bază h1, h2, h3 și suplimentare h0 și h1'). Literele mici indică regiunile nestructurate 1, 2 și 3 în cristalele 3c3v. Secvențele epitopilor IgE a Ara h3 și restul Cys 88 între stendurile E și E', implicat în formarea legăturii disulfidice între catenele α și β , sunt indicate cu bold.

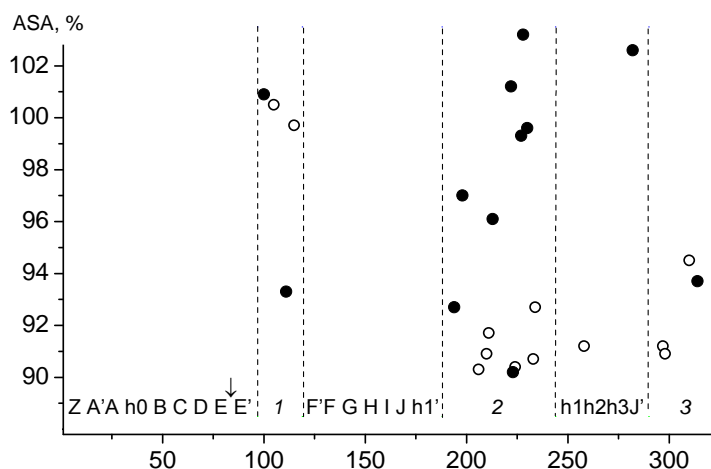


Fig.2. Resturile de aminoacizi cu accesibilitate sporită la solvent (ASA > 90%) în modelul structurii hexamere a globulinei 11S din arahide, Ara h3, sunt prezente exclusiv în α -catene și aproape exclusiv – în straturile de suprafață hidrofili 1, 2 și 3, potențial sensibile la proteoliză. Simbolurile negre arată resturile ce corespund specificității de substrat a papainei. Săgeata indică poziția restului Cys 88 implicat în formarea legăturii disulfidice între α - și β -catene.

Proteoliza globulinei 11S din arahide. SDS-PAGE, în prezența ME a preparatului purificat al globulinei 11S din arahide (Fig.3A), detectează trei benzi majore și o bandă minoră cu masele moleculare aparente apropiate de cele calculate pentru cele patru variante principale ale α -catenelor acestei proteine (*a se vedea* Tabelul). β -Catenele diferitelor subunități Ara h3 diferă puțin una de alta după masa moleculară și formează doar o singură bandă electroforetică.

În globulinele 11S din semințe α - și β -catenele sunt prezente în cantități echimolare; calculate pentru Ara h3, cantitățile molare relative ale sumei celor patru tipuri de α -catene ($11,3 + 17,3 + 19,3 + 2,0 = 49,9\%$) și β -catenelor (50,1%), în limita erorii, sunt egale. Prin urmare, se poate presupune că benzile minore x și y (Fig.3A) corespund impurităților din preparatul purificat al Ara h3, dar nu produselor hidrolizei parțiale a catenelor ei în timpul purificării.

În timpul hidrolizei cu papaină β -catenele rămân intacte, iar conținutul α -catenelor se micșorează și apar fragmentele lor (Fig.3A). Compararea rezultatelor SDS-PAGE ale produselor proteolizei în prezența și absența ME (+ME și -ME, respectiv, Fig.4A) permite separarea fragmentelor α -catenelor în două grupe. Fragmentele K (K1-K3) sunt legate de β -catene prin legătură disulfidică și, prin urmare, nu pot fi detectate în absența ME. În schimb, comportamentul fragmentelor grupei N (N1-N4) la SDS-PAGE nu depinde de prezența sau absența ME. Menționăm că fragmentul N1 nu este detectat la SDS-PAGE în prezența ME (Fig.3), deoarece el coincide după mobilitate cu β -catenele intacte (Fig.4A).

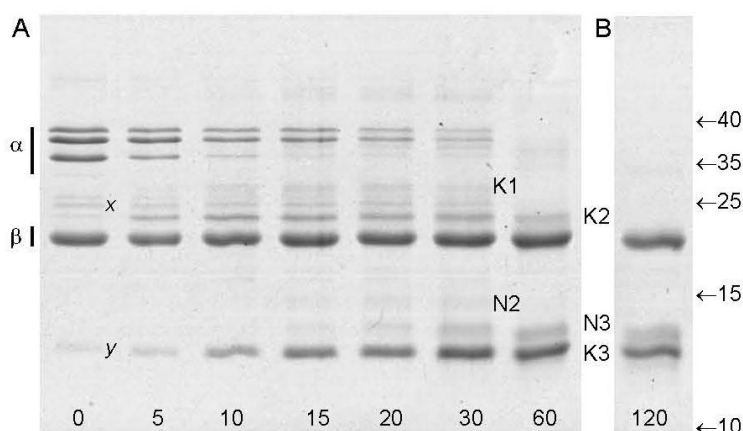


Fig.3. SDS-PAGE în prezența ME a globulinei 11S din arahide în timpul proteolizei cu papaină. Rândul de jos arată timpul de reacție (min). În dreapta sunt indicate masele moleculare ale markerilor (kDa). A și B – hidroliza în raportul enzimă / substrat de 1:1000 și 1:500, respectiv.

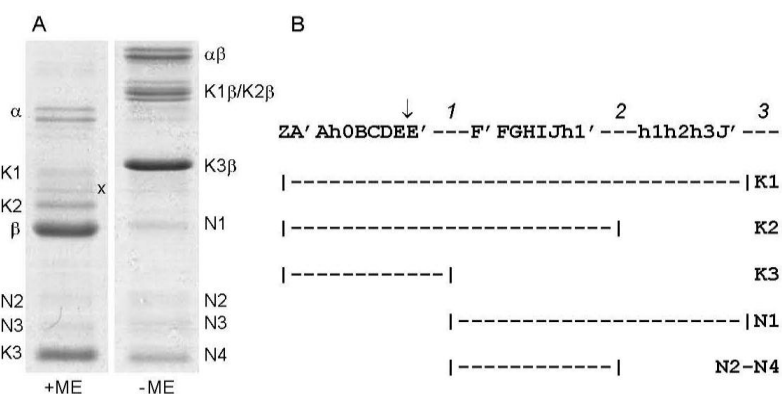


Fig.4. Proteoliza globulinei 11S din arahide cu papaină. A – SDS-PAGE în prezența și în absența ME (20 minute de reacție, enzimă / substrat 1:1000). Fragmentele N1 și N4, care coincid după mobilitate cu β -catenele și fragmentul K3, respectiv, se găsesc numai în absența ME. B – Schema reacțiilor succesive ale proteolizei α -catenei. 1, 2 și 3 – sectoarele potențial sensibile la proteoliză cu accesibilitate sporită la solvent. Săgeata indică poziția restului de Cys 88 implicat în formarea legăturii disulfidice între α - și β -catene.

Consecutivitatea probabilă a evenimentelor proteolizei Ara h3 este prezentată în Figura 4B. Reacția începe cu scurtarea C-terminală a α -catenei, care este identificată prin apariția fragmentelor K1 și K2 (scindarea în regiunile sensibile 3 și, respectiv, 2). Imediat după aceasta, scindarea buclei între strendurile E' și F' (regiunea sensibilă 1) duce la formarea fragmentului K3 și a unei serii de fragmente N: N1 din fragmentul K1 și N2-N4 din fragmentul K2. Conform acestui scenariu al proteolizei, fragmentele K1, K2 și N1, N2 sunt intermediare; într-adevăr, ele dispar la o proteoliză mai profundă (Fig.3B). Fragmentele finale N3 și N4, probabil, corespund câtorva fragmente omoloage ale α -catenelor diferitelor subunități ale Ara h3, ce diferă după masa moleculară. Sensibilitatea la atacul proteolitic, cel puțin a regiunii C-terminale a α -catenei, este caracteristică pentru toate globulinele 11S din semințe studiate în această privință [10].

În conformitate cu scenariul descris mai sus (Fig.4B), proteoliza limitată a Ara h3 scindează regiunea C-terminală a α -catenei, unde sunt prezenți trei din cei patru epitopi IgE (Fig.1). Astfel, gradul de alergenicitate a Ara h3 (ca și a glicininei din soia [2]) poate fi redus substanțial prin proteoliza sa limitată cu papaină.

Referințe:

- IVANCIUK, O., SCHEIN, C.H., BRAUN, W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. In: *Nucleic Acid Res.*, 2003, vol.31, p.359-362. ISSN 0305-1048
- CHERDIVARĂ, A., RUDACOVA, A., ȘUTOV, A. Globulinele de rezervă 11S ca alergeni. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2015, nr.6(86). p.9-11. ISSN 1814-3237
- BEARDSLEE, T.A., ZEECE, M.G., SARATH, G., MARKWELL, J.P. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h3. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p.299-307. ISSN 1018-2438
- HELM, R.M., COCKRELL, G., CONNAUGHTON, C., SAMPSON, H.A., BANNON, G.A., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C., BURKS, A.W. A soybean G2 glycinin allergen. 2. Epitope mapping and three-dimensional modeling. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p.213-219. ISSN 1018-2438
- SHUTOV, A., RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., KAKHOVSKAYA, I., SCHALLAU, A., MARUYAMA, N., WILSON, K. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: An in vitro model. In: *J. Plant Physiol.*, 2012, vol.169, p.1227-1233. ISSN 0176-1617
- RABJOHN, P., HELM, E.M., STANLEY, J.S., WEST, C.M., SAMPSON, H.A., BURKS A.W., BANNON, G. A. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h3. In: *J. Clin. Invest.*, 1999, vol.103, p.535-542. ISSN 0021-9738
- TANDANG-SILVAS, M.R.G., FUKUDA, T., FUKUDA, C., PRAK, K., CABANOS, C., KIMURA, A., ITOH, T., MIKAMI B., UTSUMI S., MARUYAMA, N. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. In: *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol.1804, p.1432-1442. ISSN 0006-3002
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685. ISSN 0028-0836
- DUNWELL, J.M., CULHAM, A., CARTER, C.E., SOSA-AGUIRRE, C.R., GOODENPUGH, P.W. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. In: *Trends Biochem. Sci.*, 2001, vol.26, p.740-746. ISSN 0968-0004
- SHUTOV, A.D., WILSON, K.A. Seed storage globulins: their descent from bacterial ancestors and mechanisms of degradation. In: Milford, S.D., ed. *Globulins: Biochemistry, Production and Role in Immunity*. New York: Nova Science Publishers, 2014, p.71-104.

Prezentat la 25.04.2017