PROTEOLIZA LIMITATĂ CA MODALITATE DE REDUCERE A ALERGENICITĂŢII GLOBULINEI DE REZERVĂ 7S DIN SEMINŢELE DE ARAHIDE

Ala CHERDIVARĂ, Serghei RUDAKOV, Angela RUDAKOVA

În timpul evoluţiei globulinelor de rezervă 7S şi 11S din seminţe în structurile lor de domeniu au apărut inserţii hidrofile extinse, care formează la suprafaţa moleculei regiuni sensebile la atacul proteolitic [1]. Proteoliza limitată a acestor zone poate duce la o scădere a alergenicităţii globulinelor de rezervă. Astfel, în timpul proteolizei limitate a globulinei 11S din soia se distruge porţiunea C-terminală extinsă a domeniului N-terminal [2], în care există determinanţii antigenici (epitopii IgE), identificaţi în subunitatea G1 a globulinei 11S din soia [3].

În această lucrare, se arată potentialul utilizării proteolizei limitate pentru a reduce alergenicitatea globulinei de rezervă 7S din arahide, Ara h1, cel mai puternic alergen dintre toate proteinele de rezervă din seminţele studiate [4].

Structura Ara h1 (pdb|3s7e şi pdb|3smh) este tipică pentru globulinele de rezervă 7S din seminţe de tipul convicilinelor, care conţin în molecula matură prelungirea nestructurată N-terminală, cu o sensibilitate crescută la atacul proteolitic [5]. În subunitatea α' a globulinei 7S din soia, similară după structură primară cu Ara h1, prelungirea N-terminală este cea mai sensibilă la proteoliză limitată cu tripsină şi este eliminată complet deja în stadiile iniţiale ale reacţiei după scindarea legăturii peptidice, care implică restul de arginină în regiunea C-terminală a acestei prelungiri [5]. În aceeaşi regiune

structurală a Ara h1, restul de Arg87 formează o legătură peptidică cu restul de Asn88 (Fig. 1) care are o accesibilitate sporită faţă de solvent. În conformitate cu aceste observaţii, probabil că acţiunea iniţială a papainei asupra Ara h1 duce la clivarea legăturii Arg87-Asn88, eliminând complet prelungirea N-terminală. Într-adevăr, fragmentul cu masă 48.7 kD, cel mai mare dintre fragmentele Ara h1 detectate la electroforeză, care se formează în etapele iniţiale ale proteolizei, cu o probabilitate mare corespunde secvenţei Asn88-Arg502 (Fig. 1, 2).

Punctele presupuse de scindare a secvenţei Ara h1, arătate în Fig. 1 şi 2, au fost obţinute în conformitate cu rezultatele electroforezei (compoziţia fragmentelor şi masa lor moleculară, transformarea secvenţială a fragmentelor mari în fragmente mai mici, detectate prin modificarea intensităţii benzilor corespunzătoare), precum şi potrivit unor alte observaţii.

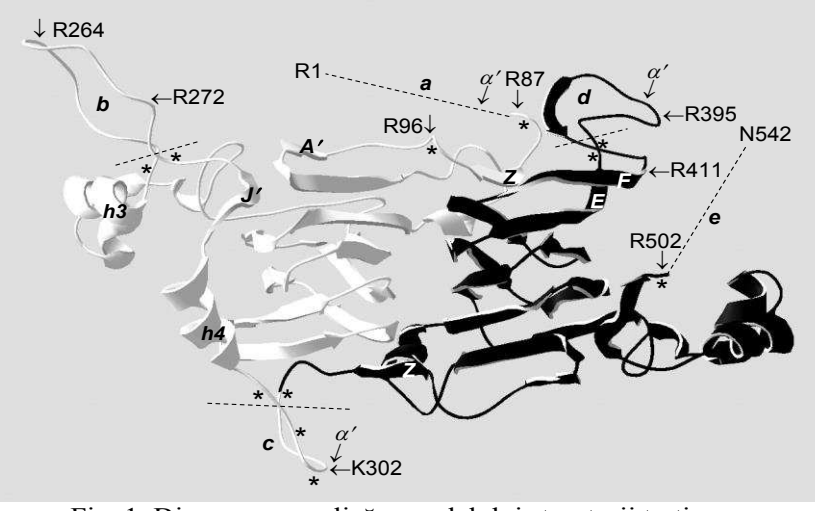


Fig. 1. Diagrama panglică a modelului structurii terţiare a subunităţilor în trimerul alergenului 7S, Ara h1, din arahide.

Partea neagră a diagramei corespunde domeniului C-terminal. Italic sunt marcate unele dintre structurile secundare ale domenuliui. Liniile punctate arată regiunile nestructurate N-terminal *(a)* şi C-terminal *(e)* ale subunităţilor, precum şi limitează regiunile *b*, *c* şi *d*, care nu sunt depistate în structurile de cristal pdb|3s7e şi pdb|3smh. Asteriscul indică poziţia resturilor de aminoacizi cu o accesibiliate

crescută faţă de solvent în structura de cristal a oligomerului pdb|3smh. Resturile de Lys şi Arg în poziţia P1 a legăturilor peptidice, care probabil sunt scindate de papaină, sunt indicate cu săgeţi drepte. Săgeata oblică arată poziţia legăturilor peptidice, scindarea cărora în structura subunităţii omoloage α′a globulinei 7S din soia au fost stabilite experimental [5].

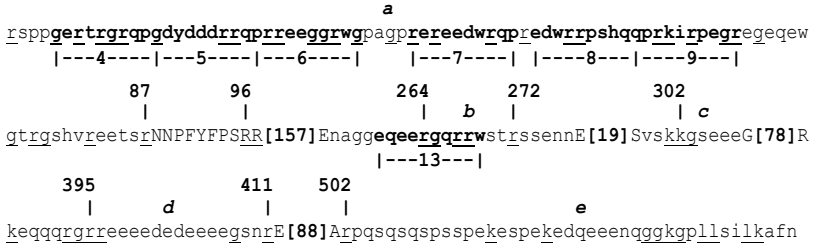


Fig. 2. Secvenţa aminoacidă a regiunilor nestructurate *a* – *e* , cel puţin în una din subunităţile Ara h1 (notată cu litere mici), şi epitopii 4-9 şi 13 identificaţi în ea. În paranteze pătrate este indicat numărul de resturi din zonele structurate ale Ara h1. Resturile, ce corespund specificităţii de substrat a papainei, sunt subliniate. Numerotarea resturilor de Lys şi Arg în poziţia P1 a legăturii peptidice, scindate de către papainăă, corespunde secvenţei proteinei mature.

Pe baza scenariului ipotetic descris *supra* (Fig. 2) şi poziţia epitopilor IgE identificaţi în subunităţile Ara h1 [4], este posibil să se estimeze potenţialul de reducere a alergenicităţii acestei proteine prin proteoliza sa limitată cu papainăă. Epitopii 1-3 aparţin porţiunii N-terminale a subunităţii Ara h1, îndepărtată prin procedee proteolitice. A treia parte din cei 18 epitopi rămaşi în molecula matură Ara h1 (epitopii 4-9, Fig.2) aparţine regiunii nestructurate N-terminală *a* şi sunt eliminaţi sub acţiunea iniţială a papainei. Această zonă este bogată în resturi de arginină şi aparent rapid se distruge cu formarea peptidelor scurte care ar trebui să reducă alergenicitatea Ara h1. Este, de asemenea, posibilă distrugerea în timpul proteolizei limitate cu papaina a regiunii nestructurate *b*, care conţine epitopul 13.

Referinţe:

1. SHUTOV, A.D. and WILSON, K.A. *Seed storage globulins: their descent from bacterial ancestors and mechanisms of degradation, in*

Globulins: Biochemistry, Production and Role in Immunity (MILFORD, S.D., ed.) Nova Science Publishers. New York, 2014, p. 71-104.
2. SHUTOV, A., et al. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: An in vitro model. In: *J. Plant Physiol*, 2012, 169, p. 1227-1233.
3. BEARDSLEE, T.A., ZEECE, M.G., SARATH, G., and MARKWELL, J.P. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. In: *Int. Arch. Allergy Immunol*, 2000, 123, p.299-307.
4. SCHIN, D.S., et al. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h 1, an abundant and highly allergenic peanut protein. In: *J. Biol. Chem*,1998, 273, p.13753-13759.
5. SHUTOV, A.D., et al. Limited proteolysis of β-conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean (Glycine max (L.) Merr.): structural and evolutionary implications. In: *Eur. J. Biochem*., 1996, 241, p.221-228.