

## GLOBULINELE DE REZERVĂ 11S DIN SEMINȚE CA ALERGENI

*Ala CHERDIVARĂ, Angela RUDACOVA, Andrei ȘUTOV*

*Universitatea de Stat din Moldova*

Proteinele de rezervă din semințele mai multor plante sunt alergene. Proteinele din semințele de arahide, inclusiv globulina de rezervă 11S Ara h3, au cea mai mare alergenicitate. Printre globulinele 11S din semințe o alergenicitate relativ mare, pe lângă Ara h3, este caracteristică subunităților globulinei 11S din soia Gly m G1, Gly m G2 și Gly m G3. S-a demonstrat o potrivire parțială a pozițiilor determinanților antigen (epitopi IgE) în secvențele de aminoacizi ale Ara h3 și globulinei 11S din soia. Se discută modalitățile posibile de reducere a alergenității globulinelor 11S din semințele de soia și din alte plante.

**Cuvinte-cheie:** globuline de rezervă 11S, alergeni, epitopi IgE, arahide, soia.

### SEED STORAGE 11S GLOBULINS AS ALLERGENS

Storage proteins in seeds of several plants are allergens. The proteins from peanut seeds, including storage 11S globulin Ara h3, are of the highest allergenicity. Among seed 11S globulins, a relatively high allergenicity in addition to Ara h3 is characteristic of subunits Gly m G1, Gly m G2 and Gly m G3 of soybean 11S globulin. A partial matching of positions of antigen determinants (IgE epitopes) in amino acid sequences of Ara h3 and soybean 11S globulin subunits was shown. Possible ways for reducing of the allergenicity of 11S globulins from the seeds of soybean and other plants is discussed.

**Keywords:** seed storage 11S globulins, allergens, IgE epitopes, peanut, soybean.

Semințele sunt o sursă importantă de proteine alimentare. O parte semnificativă a proteinelor din semințe constituie leguminele, globulinele de rezervă 11S [5]. În semințele multor plante de cultură utilizate în alimentație leguminele sunt alergeni. Cele mai alergene sunt proteinele din arahide [15], inclusiv leguminele Ara h3 și Ara h4 [12,16]. Conform datelor prezentate în SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) [9], alergene sunt leguminele din 12 plante, ale căror semințe sunt folosite în alimentație (Tab.1).

În această lucrare se examinează structura cristalină pdb|3c3v a alergenului Ara h3 din arahide și se analizează prezența probabilă a epitopilor IgE, identificați în subunitățile Ara h3, în secvențele de aminoacizi ale leguminelor altor plante din colecția SDAP. Se discută modalitățile posibile de reducere a alergenității globulinelor 11S din semințe.

**Tabelul 1**

### Subunitățile leguminelor plantelor care, potrivit SDAP, sunt alergeni

SDAP denumirea	Accession	Speciile	Denumirea abreviată
Ara h3* [16]	3703107	<i>Arachis hypogae</i>	Ara
Ara h4 [12]	5712199		
Gly m G1* [2]	169973	<i>Glycine max</i>	Gly
Gly m G2* [7,8]	295800		
Gly m G3	P11828		
Gly m G4	Q7GC77		
Gly m G5	Q9SB11		
Pru du 6 [21]	258588247	<i>Prunus dulcis</i>	Pru
Pru du 6.0101	307159112		
Pru du 6.0201	307159114		
Cor a9 [3]	18479082	<i>Corylus avellana</i>	Cor
Sin a 2.0101 [14]	Q2TLWQ	<i>Sinapis alba</i>	Sin
Car i [17]	158998780	<i>Carya illinoensis</i>	Car
Jug r 4.0101	Q2TPW5	<i>Juglans regia</i>	Jug
Ses i 6.0101	Q9XHP0	<i>Sesamum indicum</i>	Ses
Ses i 7.0101	Q9AUD2		
Ana o2 [20]	25991543	<i>Anacardium occidentale</i>	Ana

Fag e1* [23]	2317674	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Fag
Fag e1	2317670		
Fag e1	29839419		
Pis v 2.0101	110349082	<i>Pistacia vera</i>	Pis
Pis v 2.0201	110349084		
Pis v 5.0101	171853009		
Ber e2	30313867	<i>Bertholletia excelsa</i>	Ber

\*subunitățile în ale căror secvențe au fost identificați determinanții antegen (epitopii IgE).

În coloana din dreapta sunt indicate denumirile abreviate ale alergenilor utilizați în Figura 5.

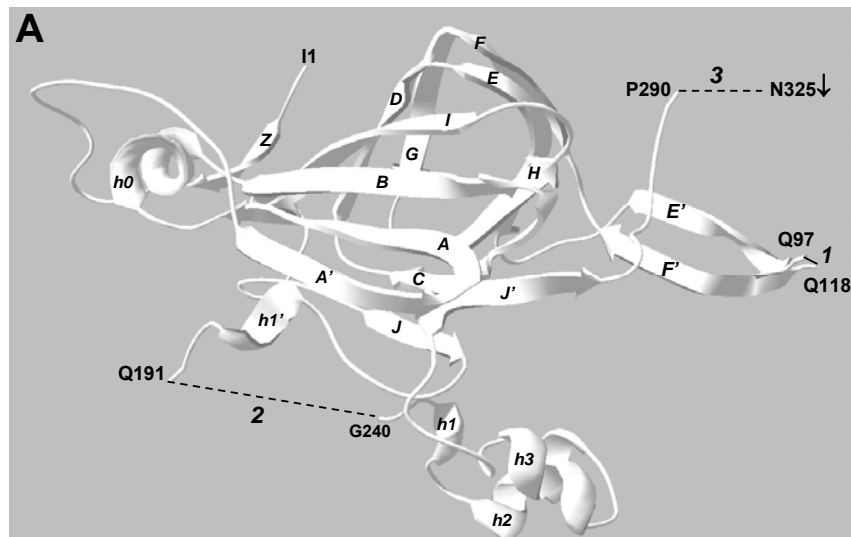
### Metode de cercetare

Pentru analiză au fost folosite următoarele programe: SDAP – pentru căutarea și caracterizarea leguminelor ca alergeni și ClustalW2 – pentru alinierea secvențelor de aminoacizi. Programa DeepView/Swiss-PDB Viewer a fost utilizată pentru analiza structurii terțiare a proteinelor și construirea diagramelor panglică. Modelarea omoloagă a structurii terțiare și cuaternare a leguminei din arahide a fost realizată cu ajutorul Swiss-model [1,4], folosind ca matriță structura cristalină a subunității sale 3c3v.

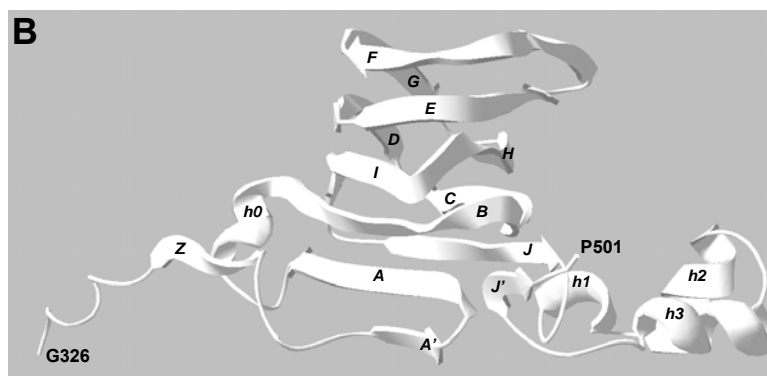
### Rezultate și discuții

**Structura alergenului Ara h3 din arahide este tipică pentru leguminele din semințele altor plante.**

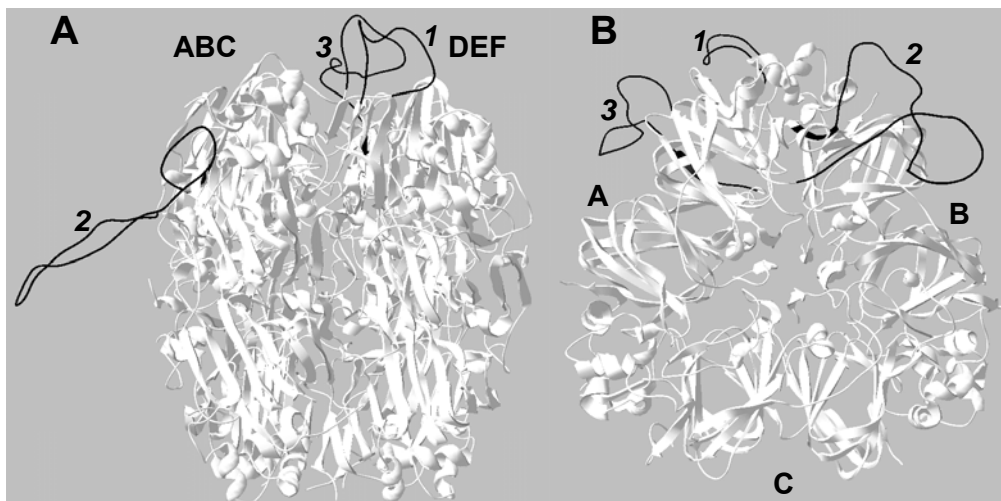
Subunitățile leguminelor sunt sintetizate într-un singur lanț polipeptidic, post-translațional despicat în  $\alpha$ - și  $\beta$ -catene (domeniile N- și C-terminale, respectiv). Domeniile N- și C-terminale structural echivalente ale leguminelor formează  $\beta$ -barrel din opt stenduri majore (*BCDEFGHI*) și un număr suplimentar de  $\beta$ -stenduri antiparalele, legat cu un grup de  $\alpha$ -helixuri [11]). Domeniile C-terminale sunt conservative, în timp ce domeniile N-terminale conțin trei inserții hidrofule nestructurate: 1 – între stendurile *E* și *F*, 2 – între  $\beta$ -barrel și grupul de  $\alpha$ -helixuri și 3 – linkerul interdomenic lungit.



**Fig.1.** Diagrama panglică a structurii terțiare a  $\alpha$ -catenei (A) și a  $\beta$ -catenei (B) leguminei 3c3v *Arachis hypogaea*. Baza structurii  $\alpha$ - și  $\beta$ -catenelor leguminei din arahide și a altor legumine îl constituie  $\beta$ -barrel cu  $\beta$ -stenduri *BCDEFGHI*, suplimentat cu  $\beta$ -stendurile *A'*, *A* și *J*, *J'* și  $\alpha$ -helixul *h0*.  $\beta$ -stendul *Z* este specific  $\alpha$ -catenei leguminei [11].  $\alpha$ -helixul *h1'* suplimentar este prezent doar în unele din leguminele cu structura terțiară cunoscută [19]. Liniile punctate arată poziția inserțiilor hidrofule 1, 2 și 3 în secvența  $\alpha$ -catenei.



În molecula oligomeră a leguminelor subunitățile sunt unite în trimeri; trimerii a două subunități se combină într-un hexamer al proteinei mature. În structurile trimere și hexamere inserțiile hidrofiele 1-3 formează straturile superficiale ale moleculei (Fig.2).



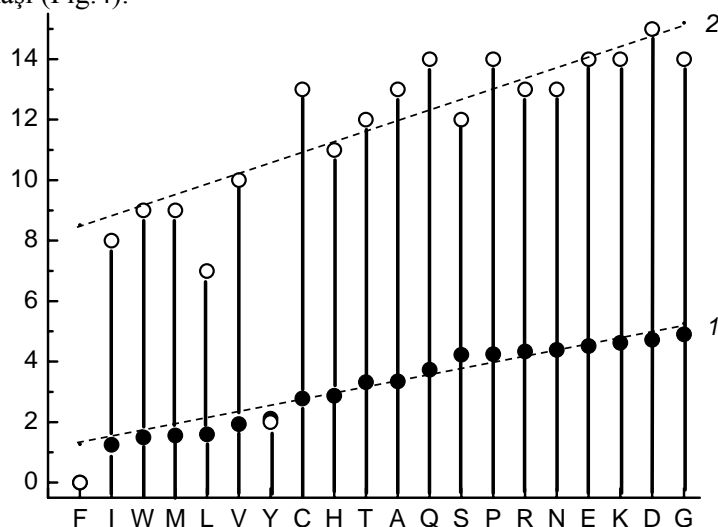
**Fig.2.** Diagrama panglică a structurii cuaternare a leguminei 3c3v *Arachis hypogaea*. A – hexamerul subunităților A-F; B – trimerul subunităților A-C. Zonele întunecate pe diagrame descriu structura modelului inserțiilor hidrofiele 1-3 în una din  $\alpha$ -catene.

**Epitopii IgE în secvențele  $\alpha$ -catenei leguminelor din arahide și soia.** În legumina Ara h3 din arahide au fost identificați patru epitopi IgE [16] (Fig.3): epitop 1 în regiunea N-terminală a  $\beta$ -barrelului ( $\beta$ -strendul *A* și  $\alpha$ -helix *h0*), epitop 2 și epitop 3, respectiv, în regiunea  $\alpha$ -helixului *h1/h2* și în regiunea adiacentă  $\beta$ -strendului *J'*, și epitop 4 în regiunea hidrofila C-terminală. În Gly m G1, legumina din soia, au fost identificați doar doi epitopi IgE [2], a căror poziție se suprapune parțial cu poziția epitopilor 2 și 3 ai leguminei din arahide. Poziția unuia din cei trei epitopi IgE ai leguminei din soia, Gly m G2 [8], prezentați în Figura 3, de asemenea se suprapune parțial cu poziția epitopului 3 al leguminei din arahide. Doi epitopi IgE imunodominanți au fost identificați și în  $\beta$ -catenele Gly m G2.

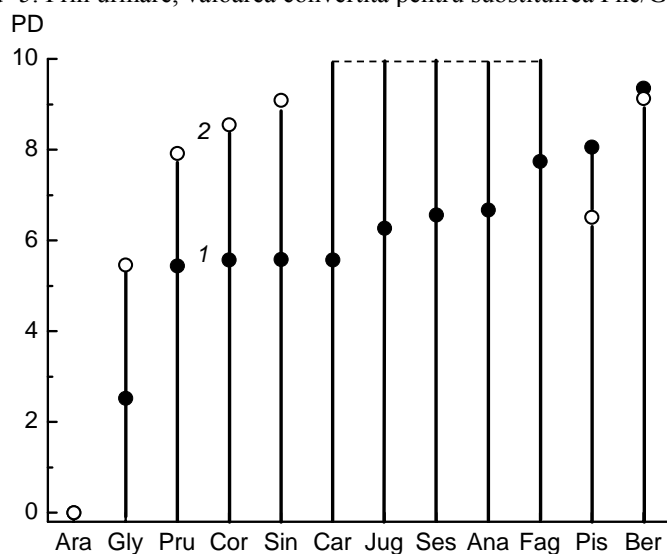
	<b>A</b>	<b>h0</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	
Ara h3	29	EGGY <b>IETWNPNNQEFECAG</b> VALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGL:					83
Gly G1	29	EGGLIETWNPNNKPFQCAGVALSRCTLNRNALRRPSYTNQGPQEIIYIQQKGIFGM:					83
Gly G2	27	EGGF <b>IETWNPNNKPFQCAG</b> VALSRCTLNRNALRRPSYTN <b>QGPQEIIYIQQGN</b> GIFGM:					81
		*** *****: *:***** *.****** *:*.*****:*****.* **:					
		<b>1</b>				<b>a</b>	
	<b>J</b>	<b>h1</b>	<b>h2</b>	<b>h3</b>			
Ara h3	174	RRFNLAGNTEQEFLRYQQ:HEGG <b>NI<b>FS</b>GF<b>TPEFLE</b>QAFQVDDRQIVQNL</b> RGENESE					273
Gly G1	161	RRFYLAGNQEQEFLKYQQ:NEGG <b>SIL<b>SGFTLEFLE</b>HAF</b> SVD-KQIAKNLQGENEGE					231
Gly G2	159	RRFYLAG <b>NQEQEFLKY</b> QQ:NEGSNILSGFAPEFLKEAFGVN-MQIVRN <b>LQGENEE</b>					229
		*** **** *****:*** ***.*****:*****:*** ** **.*:***:**** *					
		<b>b</b>		<b>2</b>			
	<b>J'</b>						
Ara h3	274	EEGAI <b>VTVRGGLRILSPDR</b> KRRAD---EEEEYDEDE- <b>YEYDEEDRRRGR</b>					318
Gly G1	232	DK <b>GAI<b>VT</b>VK<b>GGLSVI</b>K</b> PPTDEQQRPQEEEEEEDEK <b>PQCKGKDKHCQR</b>					280
Gly G2	230	DSGAI <b>VT<b>VK</b>GGLR<b>VT</b>A</b> PAMR <b>KPQQ</b> ---EEDDDDEEEQ <b>PQCVETDKGCQR</b>					275
		:.*****:*** : * . : *****:*** : **.*					
		<b>3</b>		<b>4</b>			

**Fig.3.** Epitopii IgE (text gras) identificați în secvențele de aminoacizi ale  $\alpha$ -catenei leguminelor din arahide [16] și soia [2,8]. Subliniat sunt marcate resturile de aminoacizi, a căror substituție în epitopii leguminei Ara h3 reduce alergenicitatea ei. În linia de sus se arată poziția structurilor secundare ale leguminelor [19]. În linia de jos sunt numerotați epitopii 1-4 ai Ara h3 și arătată poziția epitopilor imunodominanți a și b în Gly m G2. Prin două puncte (:) este desemnată discontinuitatea secvențelor (omisă regiunea  $\beta$ -strendurilor *FGHI* și regiunea hidrofila între  $\beta$ -barrel și  $\alpha$ -helixurile *h1-h3*).

**Antigenii determinanți potențiali în secvențele alergenilor familiei leguminelor.** Programul SDAP oferă oportunitatea aprecierii cantitative a probabilității prezenței epitopilor IgE într-o anumită proteină, a cărei alergenicitate este cunoscută sau presupusă. Metoda se bazează pe compararea proprietăților fizico-chimice ale fiecărui aminoacid din secvența epitopului IgE, identificat în proteina alergenă A, cu fiecare aminoacid din regiunea similară după structura primară în secvența proteinei cercetate B. Probabilitatea prezenței epitopului IgE în proteina cercetată este apreciată cantitativ cu ajutorul indicelui PD (Property Based Peptide Similarity Index for Two Sequences) [9]. Odată cu creșterea diferențelor dintre secvențele aminoacide ale proteinelor A și B, valoarea indicelui PD crește de la zero (secvențele sunt identice) până la valoarea maximă egală cu 10, mai sus de care prezența epitopului IgE corespunzător în proteina B este puțin probabilă [10]. Ca exemplu aducem graficul modificării indicelui PD la substituirea restului Phe în epitop 2 IgE al Ara h3 cu ceilalți 19 aminoacizi naturali rămași (Fig.4).



**Fig.4.** Substituirea restului Phe în epitop 2 IgE al Ara h3 duce atât la mărirea indicelui PD (1), cât și a valorilor convertite ale frecvenței substituiri aminoacizilor în matricea Dayhoff [6] (2). Caracterul dependențelor 1 și 2 este similar, deoarece în ambele cazuri depinde de deosebirile dintre proprietățile fizice și chimice ale Phe și ale aminoacizilor care îl substituie. Metodă de convertire a valorilor în matricea Dayhoff: din valoarea ce corespunde în matrice frecvenței de conservare a Phe se scade valoarea frecvenței de substituire a acestuia cu fiecare dintre cei 19 aminoacizi naturali. De exemplu, valoarea ce corespunde frecvenței de conservare a Phe în matrice este egală cu 9; frecvența substituiri Phe cu Gly în matrice este egală cu -5. Prin urmare, valoarea convertită pentru substituirea Phe/Gly  $9 \cdot (-5) = 9 + 5 = 14$ .



**Fig.5.** IgE epitopii potențiali în secvențele de aminoacizi ale  $\alpha$ -catenelor leguminelor. Ca matriță au fost folosite secvențele epitopilor IgE 2(1) și 3(2) ale Ara h3. Valorile indicelui PD indicate corespund celor mai mici valori obținute la analiza fiecărei specii de plante. Linia punctată reprezintă valori ale indicelui PD mai mari de 10. Denumirile complete ale speciilor enumerate sunt indicate în Tabelul 1.

IgE epitop 2 din Ara h3 aparține secvenței conservative din regiunea  $\alpha$ -helixului *h1* și *h2* (Fig.3). De aceea, cu o anumită probabilitate, IgE epitopul corespunzător poate fi prezent în secvențele tuturor leguminelor, a căror alergenicitate a fost stabilită (Tab.1). Dimpotrivă, prezența IgE epitopului 3 din Ara h3 în secvențele leguminelor altor specii este mai puțin probabilă. Studiul clinic a stabilit că acest epitop reprezintă cea mai mare alergenicitate [16]. Probabil, acesta este unul dintre motivele pentru care semințele de arahide, comparativ cu semințele altor plante, sunt alergeni mai puternici.

Printre leguminele celor 12 specii (Tab.1), a căror alergenicitate a fost stabilită, cea mai înaltă alergenicitate după arahide o au glicinina, globulina 11S din soia (Fig.5). Deoarece dintre leguminoase soia este o cultură agricolă importantă, prezentăm în Tabelul 2 evaluarea comparativă a indicelui PD obținut prin suprapunerea celor patru IgE epitopi imunodominanți identificați în subunitatea G2 din glicinina [8] cu celelalte 4 subunități ale ei.

Tabelul 2

#### Alergenicitatea potențială a subunităților de tipul I și II ale leguminei din soia

	Epitopii Gly m G2				Epitopii Ara h3	
	a	b	c	d	1	2
G2	0,00	0,00	0,00	0,00	2,87	3,67
G1	0,90	0,00	2,02	0,36	2,87	3,39
G3	1,76	0,57	0,85	2,14	2,87	2,52
G4	9,56	9,59	7,67	7,98	5,67	6,38
G5	9,60	9,89	9,32	7,97	4,90	6,38

*Notă.* Indicii PD, obținuți prin suprapunerea celor 4 epitopi IgE dominanți din subunitățile Gly m G2 (epitopii a și b,  $\alpha$ -catenă, Fig.3; epitopii c și d,  $\beta$ -catenă) cu subunitățile G1 și G3, G4 și G5 ale glicininei și a epitopilor 1 și 2 din Ara h3 cu toate cele 5 subunități ale glicininei.

Molecula heterohexameră a glicininei din soia este formată din subunități de tipul I (G1, G2 și G3) și II (G4, G5) ce diferă semnificativ după structura primară [13]. Acest lucru explică diferențele semnificative între indicii PD, obținuți pentru subunitățile de tipul I și II. Menționăm că atunci când se utilizează ca matrice epitopii IgE ai proteinei străine Ara h3, de asemenea se depistează un potențial alergen relativ scăzut al subunităților de tipul II ale glicininei.

Reducerea alergenității glicininei din soia, precum și a altor alergeni alimentari, poate fi realizată prin substituirea, după metode de inginerie genetică, a aminoacizilor în secvențele epitopiilor responsabili pentru legarea IgE. Însă, această metodă este destul de complicată și nu foarte populară în rândul consumatorilor de semințe de soia în produsele alimentare. Mai atractive sunt alte două abordări în rezolvarea problemei alergenității glicininei.

*Abordarea 1.* Proteoliza inițială a glicininei din soia se limitează la distrugerea regiunii C-terminale a  $\alpha$ -catenei [18], sensibilă la atacul proteolitic ce conține epitopii IgE. Probabil, proteoliza limitată a glicininei poate atenua semnificativ alergenicitatea ei.

*Abordarea 2.* Prin selectarea secvențială de mutații naturale de soia [22] pot fi obținute semințe, care conțin glicinina constituită exclusiv din subunități de tipul II, cu o alergenicitate relativ scăzută.

S-ar putea ca ambele abordări de rezolvare a problemei privind alergenicitatea globulinelor 11S să fie aplicate pentru alte plante, ale căror semințe sunt utilizate în produsele alimentare.

#### Bibliografie:

1. ARNOLD, K., BORDOLI, L., KOPP, J., SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. In: *Bioinformatics*, 2006, vol.22, p.195-201.
2. BEARDSLEE, T.A., ZEECE, M.G., SARATH, G., MARKWELL, J.P. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p.299-307.
3. BEYER, G., GRISHINA, G., BARDINA, L., GRISHIN, A., SAMPSON, H.A. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. In: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, vol.110 (3), p.517-523.

4. BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., CASSARINO, T.G., BERTONI, M., BORDOLI, L., SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. In: *Nucleic Acids Research.*, 2014, vol.42, W252-258.
5. CASEY, R. Distribution and some properties of seed globulins. In: Shewry, P.R., Casey, R., eds. *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1999, p.159-169.
6. DAYHOFF, M.O. A model for evolutionary change in proteins: Matrices for detecting distant relationships. In: Dayhoff M.O., ed. *Atlas of protein sequences and structures*. National Biochemical Research Foundation. Washington, DC, vol.5, suppl. 3, p.345-358.
7. HELM, R.M., COCKRELL, G., CONNAUGHTON, C., SAMPSON, H.A., BANNON, G.A., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C., BURKS, A.W., LIVINGSTONE, D., NIELSEN, N.C., BURKS, A.W. A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p.205-212.
8. HELM, R.M., COCKRELL, G., CONNAUGHTON, C., SAMPSON, H.A., BANNON, G.A., BEILINSON, V., NIELSEN, N.C. and 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.
9. 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.
10. IVANCIUK, O., MIDORO-HORIUTI, T., SCHEIN, C.H., XIE, L., HILLMAN, G.R., GOLDBLUM, R.M. Braun W. The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. In: *Mol. Immunol.*, 2009, vol.46, p.873-883.
11. JIN, T., GUO, F., CHEN, Y.W., HOWARD, A. and ZHANG, Y.Z. Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut. In: *Mol. Immunol.*, 2009, vol.46, 1796-1804.
12. KLEBER-JANKE, T., CRAMERI, R., APPENZELLER, U., SCHLAAK, M., BECKER, W.M. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1999, vol.119, p.265-274.
13. NIELSEN, N.C., NAM, Y.W. Soybean globulins. In: *Seed Proteins*. Shewry, P.R., Casey, R., eds., 1999. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.285-313.
14. PALOMARES, O., CUESTA-HERRANZ, J., VEREDA, A., SIRVENT, S., VILLALBA, M., RODRIGUES, R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. In: *Ann. Allergy Astma Immunol.*, 2005, vol.94, p.586-592.
15. PELE, M. Peanut allergens. In: *Romanian Biotechnol. Lett.*, 2010, vol.15, p.5204-5212.
16. 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 h 3. In: *J. Clin. Invest.*, 1999, vol.103, p.535-542.
17. SHARMA, G.M., IRSIGLER, A., DHANARAJAN, P., AYUSO, R., BARDINA, L., SAMPSON, H.A., ROUX, K.H., SATHE, S.K. Cloning and characterization of an 11S legumin, Car i 4, a major allergen in pecan. In: *J. Agric. Food Chem.*, 2011, vol.59, p.9542-9552.
18. 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.
19. 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.
20. WANG, F., ROBOTHAM, J.M., TEUBER, S.S., SATHE, S.K., ROUX, K.H. Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2003, vol.132, p.27-39.
21. WILLISON, L.N., TRIPATHI, P., SHARMA, G., TEUBER, S.S., SATHE, S.K., ROUX, K.H. Cloning, expression and patient IgE reactivity of recombinant Pru du 6, an 11S globulin from almond. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2011, vol.156 (3), p.267-281.
22. YAGASAKI, K., TAKAGI, T., SASAKI, M., KITAMURA, K. A mutant soybean cultivar containing glycinin composed of only A3B4 subunit. In: *J. Agric. Food Chem.*, 1997, vol.45, p.656-660.
23. YOSHIOKA, H., OHMOTO, T., URISU, A., MINE, Y., ADACHI, T. Expression and epitope analysis of the major allergenic protein Fag e 1 from buckwheat. In: *J. Plant. Physiol.*, 2004, vol.161, p.761-767.

Prezentat la 27.11.2015