

**GLOBULINELE DE REZERVĂ 7S DIN SEMINȚE CA ALERGENI.  
IMUNOREACTIVITATEA ÎNCRUCIȘATĂ ÎNTRE  
GLOBULINELE DE REZERVĂ 7S ȘI 11S**

*Ala CHERDIVARĂ, Angela RUDAKOV, Andrei ȘUTOV*

*Universitatea de Stat din Moldova*

Printre proteinele de rezervă din semințe globulina 7S din arahide, Ara h1, prezintă cea mai înaltă alergenicitate. În secvență aminoacidică a Ara h1 au fost identificați numeroși determinanți antigenici (epitopii IgE). A fost demonstrată prezența unor potențiali epitopi IgE în regiunile structural echivalente de secvențe omoloage ale 7S globulinelor din alte plante (în special, din soia). S-a stabilit existența probabilă a imunoreactivității încrucișate între Ara h1 și subunitățile Gly m G5 ale globulinei 11S din soia.

*Cuvinte-cheie: globuline de rezervă din semințe, alergeni, epitopi IgE, arahide, soia.*

**SEED STORAGE 7S GLOBULINS AS ALLERGENS.**

**CROSS IMMUNOREACTIVITY BETWEEN STORAGE 7S AND 11S GLOBULINS**

Among seed storage proteins, the peanut 7S globulin Ara h1 exhibits a highest allergenicity. Multiple antigen determinants (IgE epitopes) have been identified inside the Ara h1 amino acid sequence. The presence of potential IgE epitopes inside structurally equivalent homologous sequence regions of 7S globulins from other plants (mainly from soybeans) was shown. Probable existence of a cross-immunoreactivity between Ara h1 and the subunits of soybean 11S globulin Gly m G5 was demonstrated.

*Keywords: seed storage globulins, allergens, IgE epitopes, peanut, soybeans.*

**Introducere**

Conform datelor prezentate în SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) [1], o gamă relativ largă de globuline de rezervă 7S din semințe, utilizate în produsele alimentare, sunt alergeni (Tab.1).

**Tabelul 1**

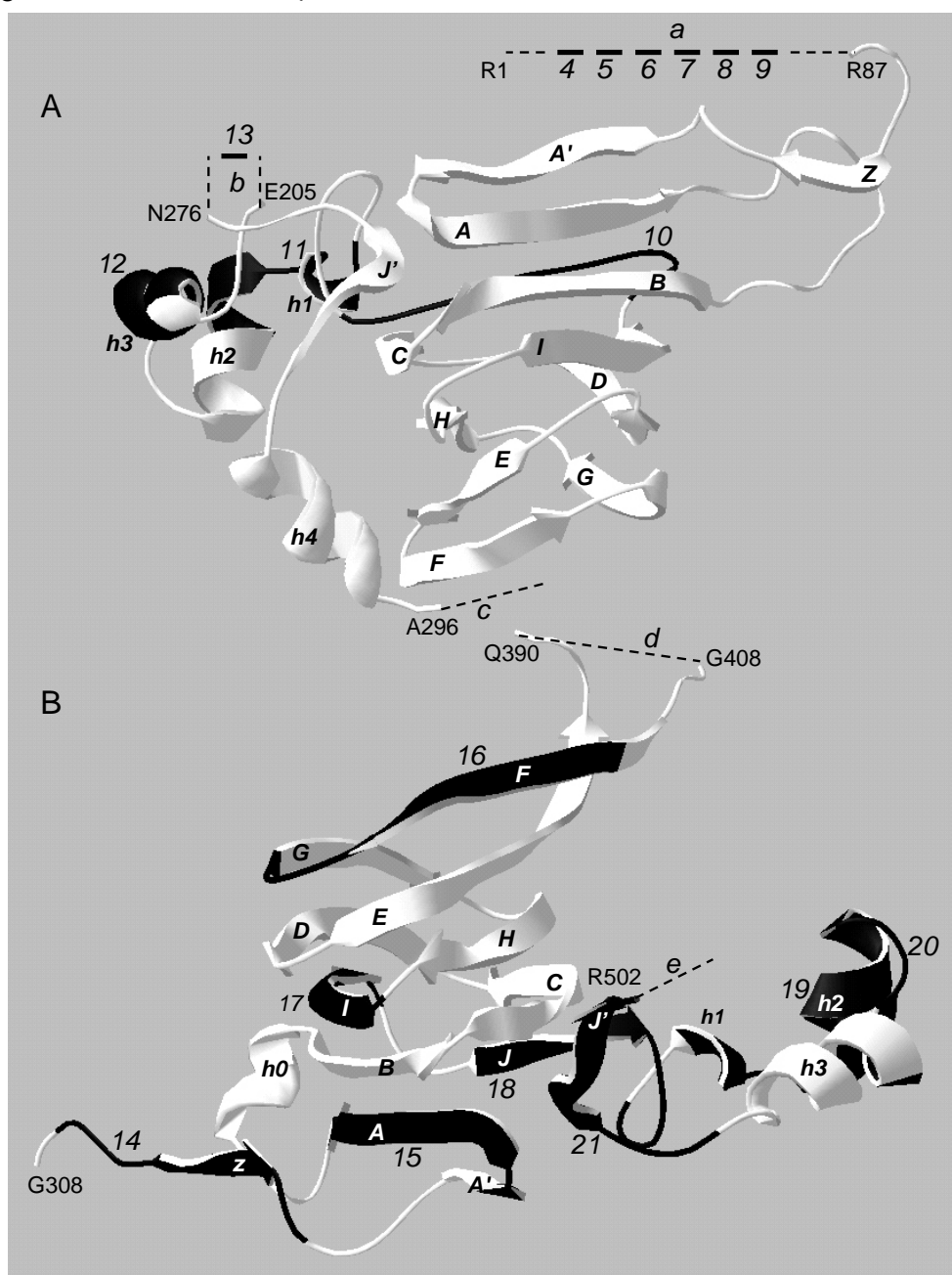
**Subunitățile alergenilor 7S**

Alergenul	Numărul de accesare	Specia	
Ara h1* [2]	P43238	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara
Ara h1	P43237		
Gly m α	18536	<i>Glycine max</i>	Gly
Gly m α'	Q9FZP9		
Gly m β	256427		
Len c 1.0101* [10]	29539109	<i>Lens culinaris</i>	Len
Len c 1.0102	29539111		
Vig r 2.0101	Q198W3	<i>Vigna radiata</i>	Vig
Vig r 2.0201	B1NPN8		
Lup an 1.0101	169950562	<i>Lupinus angustifolius</i>	Lup
Jug r 2	6580762	<i>Juglans regia</i>	Jug
Jug n 2	31321844	<i>Juglans niger</i>	
Cor a 11	19338639	<i>Corylus avellana</i>	Cor
Ses i 3	13183177	<i>Sesamum indicum</i>	Ses
Pis v 3.0101	133711973	<i>Pistacia vera</i>	Pis
Ana o 1.0101	21914823	<i>Anacardium occidentale</i>	Ana
Ana o 1.0102	21666498		

*Notă:\**- subunitățile în secvențele cărora au fost identificați determinanții antigen (epitopii IgE). În coloana din dreapta sunt indicate denumirile abreviate ale alergenilor utilizați în Figura 3.

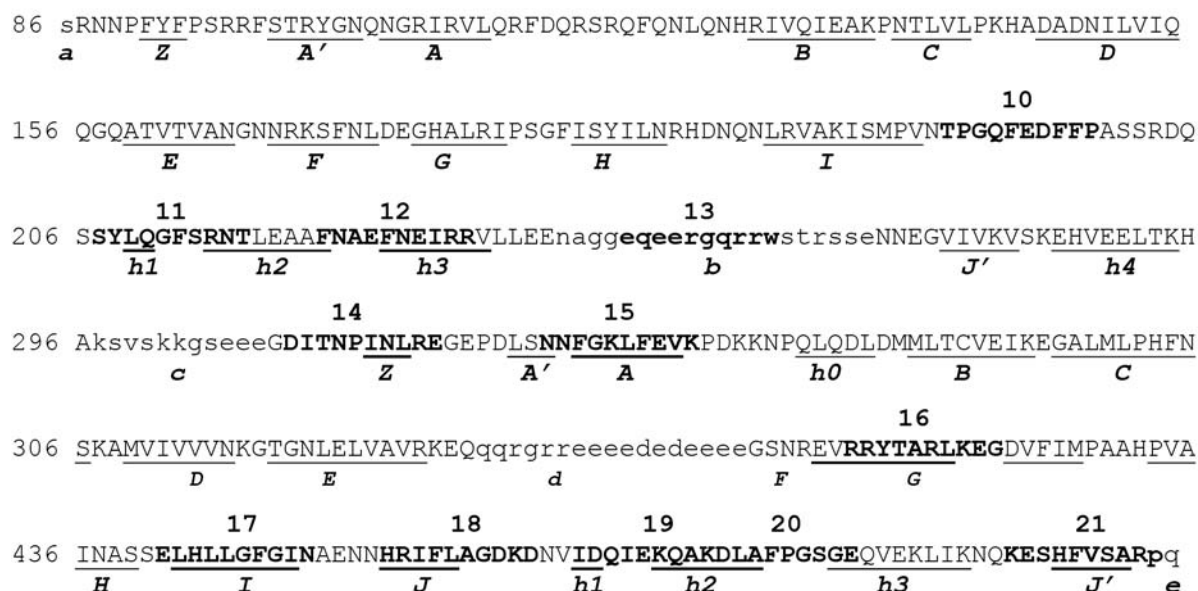
Printre globulinele 7S cea mai înaltă alergenicitate manifestă alergenul 7S din arahide, Ara h1 [2,3]. Subunitățile Ara h1 aparțin globulinelor 7S de tipul convicilinelor, ale căror secvențe conțin prelungirea N-terminală variabilă. O parte din această prelungire în molecula matură a Ara h1 este eliminată în timpul procesingului proteolitic posttranslațional [4].

Structura terțiară a subunităților Ara h1 (pdb|3s7e [5] și pdb|3smh [6]), tipică pentru familia globulinelor 7S, este formată din domeniile N- și C-terminale structural echivalente, ale căror secvențe sunt omoloage. În molecula oligomeră a Ara h1 subunitățile sunt combinate în trimeri.



**Fig.1.** Diagrama panglică a structurii terțiare a domeniilor N- (A) și C-terminale (B) ale alergenului 7S, Ara h1 (pdb|3s7e) *Arachis hypogaea*. Baza structurii domeniilor Ara h1 și a altor globuline 7S (de asemenea, a globulinelor 11S) o constituie  $\beta$ -barrel cu  $\beta$ -strendurile anitiparele *BCDEFGHI*, unit cu un grup de  $\alpha$ -helixuri *h1-h3* și suplimentat cu  $\beta$ -strendurile *A', A* și *J, J'* și  $\alpha$ -helixul *h0*.  $\beta$ -strendul *Z* suplimentar stabilizează interacțiunile între domenii. În structura domeniului N-terminal al globulinelor 7S este prezent  $\alpha$ -helixul *h4*. Liniile punctate indică poziția regiunilor alungite nestructurate *a-e* în secvența Ara h1. Zonele negre ale diagramelor corespund epitopilor IgE 4-21, prezenți în molecula matură a Ara h1 [2].

În subunitățile Ara h1 au fost identificați numeroși determinanți antigenici (epitope IgE) [2], prezenți preponderent în secvențele prelungirii N-terminale a moleculei mature (epitopii 4-9) și ale domeniului C-terminal (Fig.1,2).



**Fig.2.** Secvența de aminoacizi ai subunității alergenului 7S, Ara h1. Epitopii IgE, 10-21, sunt indicați cu bold. Structurile secundare sunt subliniate. Literele mici arată poziția porțiunilor a - e nestructurate în cristalele 3s7e.

În această lucrare, pe baza comparării secvențelor Ara h1 și altor alergeni 7S, se estimează alergenicitatea potențială a ultimelor. Se arată probabilitatea de imunoreactivitate încrucișată între 7S și 11S alergeni, care reprezintă familiile de globuline de rezervă tipice din semințe.

### Metode de cercetare

Pentru analiză am folosit următoarele programe: SDAP – pentru a căuta și caracteriza alergeni 7S și 11S, ClustalW2 – pentru alinierea secvențelor de aminoacizi și TREECON [7] – pentru analiza lor filogenetică. Alinierea structurală a secvențelor alergenilor 7S și 11S a fost efectuată în baza rezultatelor prezentate în [8]. Programul DeepView/Swiss-Pdb Viewer a fost utilizat pentru a analiza structurile terțiare ale proteinelor și construirea diagramelor panglică.

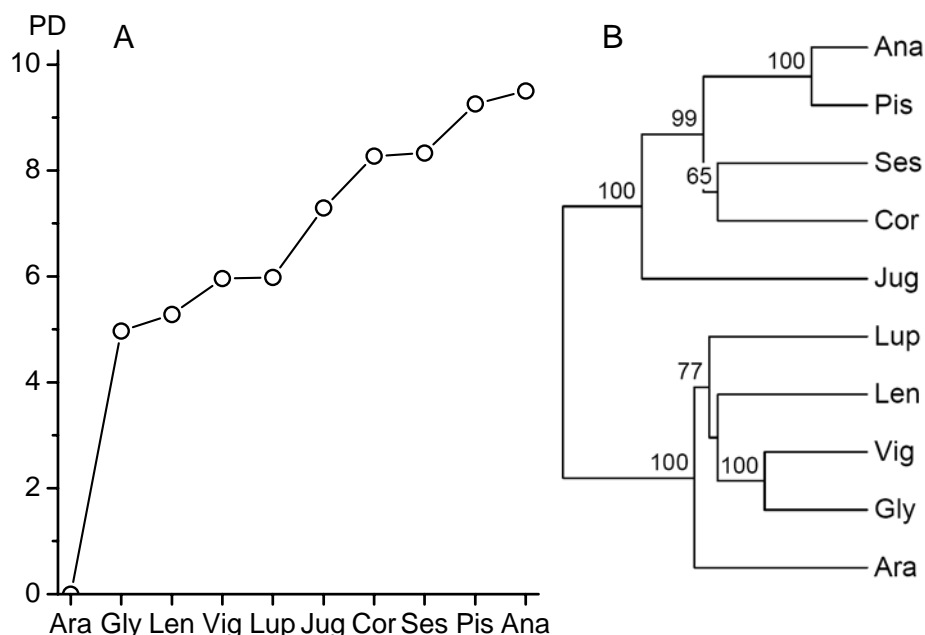
### Rezultate și discuții

**Epitopi IgE potențiali în secvențele alergenilor 7S.** Probabilitatea prezenței epitopilor IgE, similari celor identificați în Ara h1, în secvențele alergenilor 7S din alte plante poate fi apreciată cantitativ cu ajutorul indicelui PD ((Property-Based Peptide Similarity Index for Two Sequences) [9]. Odată cu creșterea diferențelor între porțiunile secvențelor comparate ale Ara h1 și ale altor proteine, valoarea indicelui PD crește de la zero (secvențele sunt identice) până la valoarea maximă egală cu 10, mai sus de care prezența epitopilor IgE corespunzători în proteina cercetată este puțin probabilă [9].

Conform acestei evaluări, epitopii 4-9 (prelungirea variabilă N-terminală) și 13-14 (Fig.1,2) sunt specifici numai pentru Ara h1. Secvențele tuturor celorlalți epitopi ai Ara h1 sunt omoloage și structural echivalente cu epitopii potențiali (PD de la 1,91 până la 6,07), descoperiți în alți alergeni 7S. În plus, epitopii 16-20 ai Ara h1 coincid la alinierea structurală cu o porțiune largă a domeniului C-terminal al alergenului 7S din linte Len c 1.0101, unde au fost identificate patru secvențe suprapuse ale epitopilor IgE [10].

La utilizarea în calitate de matrice a fiecăruia dintre epitopii Ara h1, cele mai mici valori ale indicelui PD au fost obținute preponderent pentru alergeni 7S din patru specii de plante – soia, linte, lupin și mazăre furajeră. Același grup de plante cu cea mai mare alergenicitate potențială este detectată prin compararea valorilor medii ale indicelui PD, obținute pentru alergeni 7S din nouă specii de plante (Fig.3 A). În cele din urmă, același grup de alergeni 7S formează un cluster comun cu Ara h1, la o analiză filogenetică a secvențelor

complete ale domeniilor alergenilor 7S (Fig.3). Astfel, imunoreactivitatea încrucișată între alergenii 7S din arahide și alte plante (în special, soia), apropiați după structura primară, este foarte probabilă (Tab.2, epitopii *a/a'* și *c/c'*).



**Fig.3.** Valorile medii ale indicelui PD, obținute prin compararea secvențelor regiunilor omoloage ale epitopilor 10-12 și 15-21 ai Ara h1 și alergenilor 7S ai altor plante (A), și analiza filogenetică a secvențelor domeniilor (418 poziții de aliniere) alergenilor 7S (B). Numerele de sus ale ramurilor dendrogramei corespund suportului statistic al clusterelor (% din 1000 replicații).

**Imunoreactivitate încrucișată între alergenii 7S și 11S din arahide și soia.** Secvențele aminoacide ale globulinelor 7S și 11S, care derivă dintr-un precursor comun bacterian constituit din două domenii [11], sunt omoloage și structural echivalente [12]. De aceea, sursa similitudinii între secvența epitopului *a* din Ara h1 și un potențial epitop *b* din alergenul 11S din soia, Gly m G5 (Tab.2), este evidentă: ei aparțin regiunilor omoloage, conservative în structura primară a globulinelor 7S și 11S. Întors, similaritatea secvenței epitopului *c* din Ara h1 și un potențial epitop *d* din alergenul 11S din soia, Gly m G5, care aparțin regiunilor conservate, dar unor elemente diferite ale structurilor primare și terțiare ale alergenilor 7S și 11S, poate fi numai accidentală.

**Tabelul 2**

**Unii dintre epitopii IgE ai alergenilor 7S și 11S din soia și arahide**

Alergen	Epitop IgE	PD	2D
7S, Ara h1	<b><i>a</i></b> SYLQ <u>G</u> FSRNT	0,00	N, <i>h1-h2</i>
7S, Gly m $\alpha$	<b><i>a'</i></b> SYLQ <u>G</u> FSRNI*	1,91	
11S, Gly m G5	<b><i>b</i></b> SVLS <u>G</u> FSKHF*	6,85	
11S, Gly m G1	<b><i>b'</i></b> GGSILSGFTLEFLEHAFSV	>10	
7S, Ara h1	<b><i>c</i></b> KDLA <u>F</u> PGSGE	0,00	C, <i>h2-h3</i>
7S, Gly m $\alpha$	<b><i>c'</i></b> QELAF <u>F</u> PGSAQ*	4,71	
11S, Gly m G5	<b><i>d</i></b> IGFA <u>F</u> PGCPE*	8,91	N, <i>E-F</i>
11S, Gly m G2	<b><i>d'</i></b> QQGNGIFGMIFPGCPS	>10	

*Notă:* Resturile de aminoacizi, substituția cărora duce la pierderea capacității de legare a epitopului cu IgE, sunt subliniate. Asteriscul indică secvența epitopilor potențiali. Secvențele epitopilor IgE reali: *a* și *c*, respectiv epitopii 11 și 20 din Ara h1 [2]; *b'*, epitopul 1 din Gly m G1 [13]; *d'*, epitopul 3 din Gly m G2 [14]. În coloana din dreapta este indicată poziția epitopilor în structura domeniului N- sau C-terminal.

### Concluzii

Doi factori pledează în favoarea imunoreactivității încrucișate propuse între alergenii 7S și 11S din arahide și soia.

În primul rând, resturile aminoacide, esențiale pentru legarea epitopilor *a* și *c* din Ara h1 cu IgE (Tab.2), respectiv, sunt prezente și în secvențele epitopilor potențiali *b* și *d* din alergenul 11S, Gly m G5.

În al doilea rând, secvențele epitopilor potențiali *b* și *d* din alergenul 11S, Gly m G5, coincide parțial cu epitopii reali *b'* și *d'* identificați în alergenii 11S, Gly m G1 și Gly m G2, corespunzător. Un interes deosebit prezintă analiza directă într-o singură serie de experimente a imunoreactivității încrucișate între alergenul 7S din arahide, Ara h1 (cel mai puternic alergen dintre globulinele de rezervă din semințe) și alergenii 11S din soia.

### Referințe:

1. IVANCIUK, O., SCHEIN, C.H., BRAUN, W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. In: *Nucleic Acid Res.*, 2003, 31, p.359-362.
2. SHIN, D.S., COMPADRE, C.M., MALEKI, S.J., KOPPER, R.A., SAMPSON H., HUANG, S.K., BURKS, A.W. and BANNON G.A. 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.
3. PELE, M. Peanut allergens. In: *Romanian Biotechnol. Lett.*, 2010, 15, p.5204-5212.
4. WICHERS, H.J., de BEYER, T., SAVELKOU, F.J., van AMERONGEN, A. The major peanut allergen Ara h1 and its cleaved-off N-terminal peptide; possible implications for peanut allergen detection. In: *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p.4903-4907.
5. CHRUSZCZ, M., MALEKI, S.J., MAJOREK, K.A., DEMAS, M., BUBLIN, M., SOLBERG, R., HURLBURT, B.K., RUAN, S., MATTISOHN, C.P., BREITENRDER, H., MINOR, W. Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen. In: *J. Biol. Chem.*, 2011, 286, p.39318-39327.
6. CABANOS, C., URABE, H., TANDAHO-SILVAS, M.R., UTSUMI, S., MIKAMI, B., MARUYAMA, N. Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1. In: *Mol. Immunol.*, 2011, 49, p.115-123.
7. VAN de PEER, Y. & De WACHTER, R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. In: *Comput. Appl. Biosci.*, 1994, 10, p.569-570.
8. ADACHI, M., TAKENAKA, Y., GIDAMIS, A. B., MIKAMI, B., and UTSUMI, S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. In: *J. Mol. Biol.*, 2001, 305, p.291-305.
9. IVANCIUK, O., MIDORO-HORIUTI, T., SCHEIN, C.H., XIE, L., HILLMAN, G.R., GOLDBLUM, R.M. and BRAUN, W. The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. In: *Mol. Immunol.*, 2009, 46, p.873-883.
10. VEREDA, A., ANDREAE, D.A., LIN, J., SHREFFLER, W.G., IBANEZ, M.D., CUESTA-HERRANZ J., BARDINA L. and SAMPSON, H.A. Identification of IgE sequential epitopes of lentil (Len c 1) by means of peptide microarray immunoassay. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, 126, p.596-601.
11. RUDAKOVA, A.S., CHERDIVARA, A.M., WILSON, K.A., SHUTOV, A.D. Seed storage globulins: origin and evolution of primary and higher order structures. In: *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80, p.1354-1361.
12. 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.). New York: Nova Science Publishers, 2014, p.71-104.
13. 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.
14. 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, 123, p.213-219.

Prezentat la 25.03.2016