

CZU: 577.11: 581.19 : 581.48

PROTEOLIZA LIMITATĂ A ALERGENULUI ARA H1, GLOBULINA DE REZERVĂ 7S DIN SEMINȚELE DE ARAHIDE

*Ala CHERDIVARĂ, Angela RUDAKOVA,
Serghei RUDAKOV, Andrei ȘUTOV*

Universitatea de Stat din Moldova

Este descris un scenariu ipotetic al proteolizei limitate cu papaină a globulinei de rezervă 7S, Ara h1, cel mai puternic alergen din semințele de arahide. Scenariul se bazează pe rezultatele electroforezei produselor proteolizei cu masa moleculară mare, precum și pe informațiile disponibile cu privire la prezența în subunitățile Ara h1 a regiunilor nestructurate, potențial sensibile la atacul proteolitic. S-a constatat că proteoliza limitată inițială a Ara h1 duce la scindarea regiunii N-terminale nestructurate a subunității, care conține o treime din numărul total de determinanți antigenici (epitopii IgE), identificați în Ara h1. Evident, regiunea N-terminală, bogată în resturi de arginină, care corespund specificității de substrat a papainei, este complet scindată în timpul proteolizei. Astfel, nivelul de alergenitate al Ara h1 poate fi redus prin proteoliza sa limitată.

Cuvinte-cheie: globuline de rezervă 7S din semințe, alergeni, epitopi IgE, arahide.

LIMITED PROTEOLYSIS OF ALLERGEN ARA H1, STORAGE 7S GLOBULIN FROM PEANUT SEEDS

A hypothetical scenario of papain limited proteolysis of storage 7S globulin Ara h1, the strongest allergen from peanut seeds, is described. The scenario is based on the results of electrophoresis of proteolysis of high-molecular-mass products as well as on the available information on the presence of disordered regions potentially susceptible to proteolytic attack in the Ara h1 subunits. It was demonstrated that the initial Ara h1 limited proteolysis leads to the detachment of the subunit N-terminal disordered region containing one third of the total number of antigen determinants (IgE epitopes) identified in the Ara h1. Obviously, the N-terminal region teeming with arginine residues, which correspond to papain specificity, is completely destroyed during proteolysis. Thus, the level of Ara h1 allergenicity can be decreased via limited proteolysis.

Keywords: seed storage 7S globulins, allergens, IgE epitopes, peanut.

Introducere

Printre proteinele din semințe cea mai mare alergenitate manifestă globulina de rezervă 7S (alergenul 7S), Ara h1, din arahide [1], în secvența aminoacidă a căreia au fost identificați numeroși determinanți antigenici (epitopi IgE) [2]. Dovezile indirecte au sugerat că proteoliza limitată poate duce la reducerea parțială a alergenității Ara h1 prin eliminarea din molecula ei a regiunilor care conțin epitopii IgE [3].

Până în prezent, s-a acumulat o mare cantitate de material despre legăturile definite structural de proteoliza limitată a globulinelor 7S și 11S [4], care aparțin la două familii conservative de proteine de rezervă din semințe [5]. Subunitățile, constituite din două domenii ale globulinelor oligomere 7S și 11S, care derivă dintr-un precursor bacterian comun [6], sunt omoloage și structural echivalente. Domeniile în subunitățile globulinelor 7S și 11S formează β -barrelul, constituit din β -strenduri antiparalele, unit cu un grup de α -helixuri [7]. În timpul evoluției globulinelor de rezervă din semințe, în structurile domeniilor au apărut inserții extinse hidrofiele, care formează la suprafața moleculei zone sensibile la atacul proteolitic [4,8]. Proteoliza limitată a acestor regiuni, în cazul în care conțin epitopi IgE, poate duce la reducerea alergenității globulinelor de rezervă. Astfel, în timpul proteolizei limitate a globulinei 11S din soia se distruge regiunea extinsă C-terminală a domeniului N-terminal [9], care conține unii dintre epitopii IgE identificați în alergenii 11S din soia Gly m G1 și Gly m G2 [10,11].

În această lucrare, pe baza analizei legăturilor definite structural de proteoliză limitată a alergenului 7S, Ara h1, din arahide cu papaină se estimează posibilitățile potențiale ale reducerii alergenității sale.

Material și metode

Pentru izolarea alergenului 7S, Ara h1, faina degresată din cotiledoanele arahidelor (*Arachis hypogaea* L.) a fost extrasă cu soluție tampon A (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,02% Na₃N, 1 mM EDTA). Ara h1 din extract a fost precipitat cu sulfat de amoniu (fracția 70-100% de saturație). Precipitatul a fost dizolvat în 3,0 M NaCl

în soluția tampon A și apoi a fost introdus într-o coloană (2,6 x 9 cm) fenil-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech), echilibrată cu 3,0 M NaCl în soluția tampon A. După îndepărtarea fracției neadsorbite, Ara h1 a fost eluată cu 2 M NaCl în soluția tampon A.

Ara h1 a fost hidrolizată cu papaină (Sigma Life Science) la 30°C. Amestecul de reacție a conținut 5 mg/ml substrat și 50 μg/ml enzimă în soluția tampon B (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, ajustat cu NaCl la puterea ionică 0,5, conținând 0,02% NaN₃). Reacția a fost stopată prin adăugarea acidului tricloracetic până la concentrația finală de 5%. În unele cazuri, reacția a fost stopată prin adăugarea E-64 (trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butan, Sigma, Life Science) până la concentrația finală de 10 μM, și hidrolizatele au fost cercetate prin gelfiltrare pe Sephacryl S-300 High resolution (Pharmacia Biotech) în soluție tampon B (coloana 0,9 x 75 cm).

Proteina reziduală în hidrolizate a fost cercetată prin SDS-PAGE (DSS-electroforeză în gel de poliacrilamidă) într-un gel de 15%, în sistemul tampon Laemmli [12]. Am folosit markerii moleculari PageRuler, Thermo Scientific (Lituania). Electroforegramele au fost scanate (ImageScanner III, GE Healthcare) și analizate cu ajutorul programei Phoretix 1D Gel Analysis v.5.10.

Pentru a modela structura trimerului Ara h1 am folosit programa SWISS-Model [13,14] (pdb|3s7e ca matriță). Suprafața unui rest aminoacid din structura proteinei disponibilă la solvent (ASA), exprimată în Å², a fost determinată cu ajutorul programei <http://cib.ct.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>. Valoarea relativă a ASA a fost exprimată în % din disponibilitatea restului X în tripeptida GXG. Programa DeepView/Swiss-PdbViewer v.3.7 a fost utilizată pentru construirea diagramelor panglică ale structurii terțiare a Ara h1 și pentru alinierea structurală a globulinelor 7S. Alinierea secvențelor complete ale globulinelor 7S a fost realizată folosind programa Clustal Omega.

Pentru identificarea punctelor de scindare probabile ale Ara h1 în timpul proteolizei am folosit rezultatele electroforezei (compoziția fragmentelor polipeptidice și masele lor moleculare aparente conform SDS-PAGE; transformarea consecutivă a fragmentelor mari în fragmente mai mici, identificate prin modificarea intensității benzilor corespunzătoare), precum și următoarea informație de mai jos.

1. Rezultatele comparării structurilor terțiare ale Ara h1 și altor globuline 7S, a căror proteoliză limitată este descrisă în [6], permit *a priori* determinarea poziției celor mai probabile zone de scindare ale Ara h1. O disponibilitate la solvent sporită a acestor zone, din structura Ara h1 și alte globuline 7S, poate fi considerată ca un indice al sensibilității lor potențiale la proteoliza limitată [4].

2. Punctele de clivare estimate în regiunile potențial sensibile ale moleculei Ara h1 trebuie să corespundă specificității primare de substrat a papainei (resturile Arg, Lys, Leu și Gly în poziția P1 în absența restului Val în poziția P1').

Există două variante ale subunităților Ara h1 din semințele de arahide (P43237 și P43238), ale căror molecule mature aproape nu se deosebesc una de alta după masa moleculară (respectiv, 61,6 și 62,0 kD) și similare după secvență (mai puțin de 3% din substituții neconservative și deleții). În această lucrare, pentru determinarea maselor moleculare ale fragmentelor am folosit secvența P43238, cea mai detaliat studiată variantă a Ara h1.

Rezultate și discuții

Cu câteva excepții, structura Ara h1 (pdb|3s7e [15] și pdb|3smh [16]) este tipică pentru globulinele de rezervă 7S din semințe, de tipul convicinelor, care conține în molecula matură prelungirea N-terminală nestructurată cu o sensibilitate crescută la atacul proteolitic [8]. În subunitatea α' a globulinei 7S din soia, similară după structura primară cu Ara h1, prelungirea N-terminală este cea mai sensibilă la proteoliza limitată cu tripsină și este complet eliminată deja în stadiile inițiale ale reacției după scindarea legăturilor peptidice cu participarea restului de arginină din regiunea C-terminală a acestei prelungiri [17]. În aceeași regiune structurală a Ara h1, restul Arg87 formează o legătură peptidică cu restul Asn88 (Fig.1), care are o disponibilitate sporită la solvent. În conformitate cu aceste observații, este probabil că acțiunea inițială a papainei asupra Ara h1 duce la scindarea legăturii Arg87-Asn88, eliminând complet prelungirea N-terminală.

Una dintre caracteristicile specifice ale Ara h1 este prezența în molecula sa nu doar a prelungirii N-terminale, ci și a prelungirii C-terminale nestructurate relativ extinse (regiunea e, Fig.1), în porțiunea N-terminală a căreia este prezent restul Arg502 cu o disponibilitate sporită la solvent. Prin urmare, legătura peptidică Arg502-Pro503 este potențial sensibilă la atacul papainei. Scindarea estimată a legăturilor Arg87-Asn88 și Arg502-Pro503, care elimină atât prelungirea N-terminală, cât și C-terminală, trebuie să fie însoțită de formarea fragmentului cu o masă moleculară de 47,2 kD (fragmentul I, Tab.1).

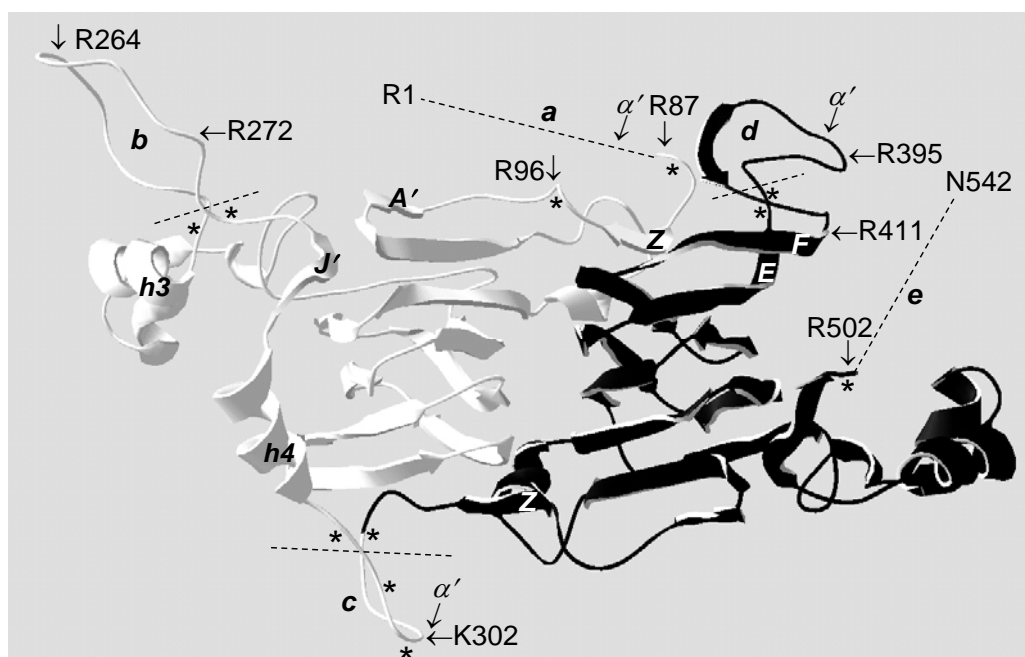


Fig.1. Diagrama panglică a modelului structurii terțiare a subunităților în trimerul alergenului 7S, Ara h1, din arahide. Partea întunecată (neagră) a diagramei corespunde domeniului C-terminal. Italic sunt marcate unele dintre structurile secundare ale domeniului. Liniile punctate arată regiunile nestructurate N-terminale (a) și C-terminale (e) ale subunităților, precum și limitează regiunile, care fie complet (regiunea b și d), fie parțial (regiunea c) nu se depistează în structurile cristaline pdb|3s7e și pdb|3smh. Asterixul indică poziția resturilor de aminoacizi cu o disponibilitate sporită (> 80%) la solvenți în structura cristalină a oligomerului pdb|3smh. Resturile de Arg și Lys în poziția P1 a legăturii peptidice, care probabil sunt scindate de papaină, sunt notate cu săgeți drepte. Săgeata oblică arată amplasarea legăturilor peptidice, a căror scindare în structura omoloagă a subunității α' a globulinei 7S din soia a fost stabilită experimental [17].

Tabelul 1

Legături peptidice scindate de papaină în subunitățile Ara h1

Nr.	Regiunea de secvență	Masa moleculară, kD	
		Prezisă	SDS-PAGE
1	<i>a-e</i> N88-r502	47,17	48,7*
2	<i>a-d</i> r54-r395	39,06	39,6
3	<i>a-d</i> N88-r395	35,08	35,5
4	<i>a-c</i> N88-k302	24,70	25,6
5	<i>c-e</i> g303-r502	22,48	24,5*
6	<i>a-b</i> N88-r272	21,40	21,0
7	<i>a-b</i> R97-r264	19,25	19,4
8	<i>b-d</i> s273-r395	13,70	14,0
9	<i>d-e</i> r396-r502	12,10	12,8*
10	<i>d-e</i> e412-r502	10,14	11,7*
9a	<i>c-d</i> g303-r411	12,36	12,8

Notă. Literele mici arată resturile de aminoacizi, care aparțin regiunii nestructurate a cel puțin uneia dintre subunități. Numerotarea resturilor de aminoacizi corespunde moleculei mature a Ara h1 [18]. Asterixurile indică masele moleculare aparente, ceva mai mari datorită prezenței în fragment a restului de Asn437 glicozilat.

În timpul hidrolizei cu papaină cel mai mare dintre fragmentele Ara h1 (fragmentul 1 cu masa moleculară aparentă de 48,7 kD, Fig.2), care predomină cantitativ în etapele inițiale ale reacției, cu o probabilitate ridicată corespunde secvenței Asn88-Arg502 (Tab.1). Orice alte căi alternative de formare a fragmentului 1 cu masa moleculară de aproximativ 49 kD sunt practic imposibile, deoarece sunt asociate cu scindarea legăturilor

Lungimea regiunii *b*, potențial sensibilă la proteoliză, în domeniul N-terminal a Ara h1, reprezintă încă una dintre particularitățile sale individuale, care și determină modul de formare a fragmentelor polipeptidice 6, 7 și 8 descrise mai sus. Astfel, în subunitățile globulinei 7S din soia regiunea corespunzătoare este relativ scurtă și insensibilă la acțiunea papainei și tripsinei. Prin urmare, proteoliza în partea centrală a subunităților α' și β ale globulinei 7S din soia se limitează la scindarea linkerului interdomenic [17, 19] (corespunzând regiunii *c* din subunitățile Ara h1).

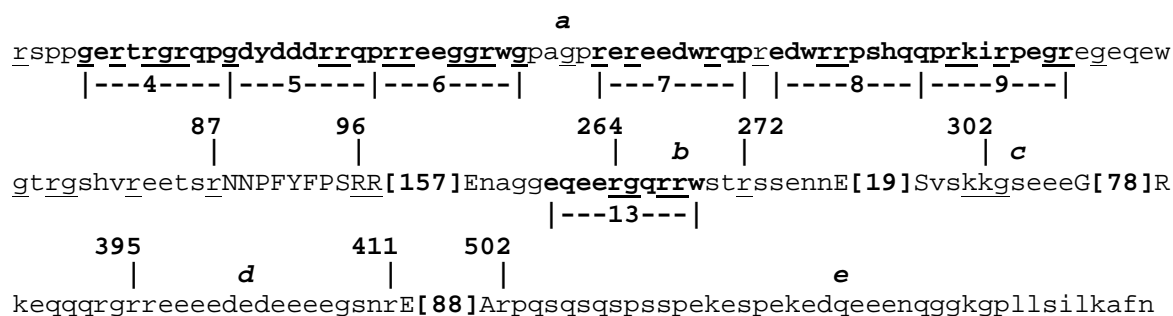


Fig.4. Secvențele de aminoacizi ale regiunilor *a-e*, care sunt nestructurate în cel puțin una dintre subunitățile Ara h1 (prezentate cu litere mici), și epitopii 4-9 și 13 identificați în ele. În paranteze pătrate este indicat numărul de resturi în zonele structurate ale Ara h1. Resturile ce corespund specificității primare de substrat a papainei sunt subliniate.

În structura Ara h1 în regiunea *c* sunt prezente resturi de aminoacizi cu o disponibilitate sporită la solvent (Fig.1). Prin urmare, este posibil că fragmentele 4 și 5 nementionate anterior sunt formate din fragmentul 1, după clivarea legăturii Lys302-Gly303 din partea centrală a regiunii *c*. Evident că fragmentele 4 și 5 (ca și fragmentul 1) sunt intermediare, deoarece secvențele lor conțin regiunile sensibile *b* și *d*, respectiv. Clivajul în aceste zone poate duce la apariția unor cantități suplimentare ale fragmentelor finale 7 și 10 și la apariția fragmentului 9a (Fig. 3), similar după mobilitate cu fragmentul 9 (Tab.1).

Se pare că există două căi independente de proteoliză a Ara h1, datorită clivajului preferențial în etapele inițiale ale procesului de una dintre cele două regiuni nestructurate (regiunea *b* sau regiunea *c*) potențial sensibile la atacul proteolitic. Ar trebui menționat faptul că în oligomerul pdb|3smh disponibilitatea la solvent a acestor zone într-o varietate de subunități nu este aceeași. În plus, regiunea *c* poate fi considerată nestructurată condițional, deoarece oricare dintre resturile de aminoacizi ale acestei regiuni sunt depistate în componența structurii cristaline a unei sau altei subunități pdb|3smh. Astfel, disponibilitatea potențială la atacul proteolitic a regiunilor *b* și *c* în diferite subunități ale oligomerului Ara h1 poate fi inegală, ceea ce determină un mod particular de proteoliză a acestora.

Concluzii

Pe baza scenariului ipotetic descris mai sus (Fig.3) și poziției epitopilor IgE identificați în subunitățile Ara h1 [2] poate fi evaluat potențialul de a reduce alergenicitatea acestei proteine prin proteoliza sa limitată cu papaină. Epitopii 1-3 aparțin regiunii N-terminale a subunității Ara h1, eliminate în timpul procesingului proteolitic [18]. A treia parte a celor 18 epitopii rămași în molecula matură a Ara h1 (epitopii 4-9, Fig.4) aparțin regiunii N-terminale nestructurate *a* și sunt eliminați la acțiunea inițială a papainei. Această zonă este bogată în resturi de arginină și aparent este distrusă rapid cu formarea peptidelor scurte, ceea ce ar trebui să reducă alergenicitatea Ara h1. Este probabilă, de asemenea, distrugerea în timpul proteolizei limitate cu papaină a regiunii nestructurate *b*, care conține epitopul 13.

Referințe:

1. PELE, M. Peanut allergens. In: *Romanian Biothechnol. Lett.*, 2010, vol.15, no.2, p.5204-5212. ISSN 1224-5984
2. SHIN, D.S., COMPADRE, C.M., MALEKI, S.J., KOPPER, R.A., SAMPSON, H., HUANG, S.K., BURKS, A.W., 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, vol.273, p.13753-13759. ISSN 0021-9258
3. WILSON, K.A., TAN-WILSON, A. Proteolysis of the peanut allergen Ara h 1 by an endogenous aspartic proteinase. In: *Plant Physiol. Biochem.*, 2015, vol.96, p.301-310. ISSN 0981-9428

4. 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. ISBN 978-1-63117-781-1
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. ISBN 978-94-010-5904-6
6. RUDAKOVA, A.S., CHERDIVARĂ, A.M., WILSON, K.A., SHUTOV, A.D. Seed storage globulins: origin and evolution of primary and higher order structures. In: *Biochemistry* (Moscow), 2015, vol.80, p.1354-1361. ISSN 0006-2979
7. ADACHI, M., TAKENAKA, Y., GIDAMIS, A.B., MIKAMI, B., and UTSUMI, S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. In: *J. Mol. Biol.*, 2001, vol.305, p.291-305. ISSN 0022-2836
8. SHUTOV, A.D., BLATTNER, F.R., BAUMLEIN, H. and MUNTZ, K. Storage and mobilization as antagonistic unctinal constraints of seed storage globulin evolution. In: *J. Exp. Bot.*, 2003, vol.54, p.1645-1654. ISSN 0022-0957
9. 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 176-1617
10. 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. ISSN 1018-2438
11. HELM, R.M., COCKRELL, G., CONNAUGHTON, C., SAMPSON, H.A., G.A., BANNON, V., BEILINSON, N.C., NIELSEN, 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
12. 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
13. 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. ISSN 1367-4803
14. 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, p.252-258. ISSN 0305-1048
15. 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, vol.286, p.39318-39327. ISSN 0021-9258
16. CABANOS, C., URABE, H., TANDANG-SILVAS, M.R., UTSUMI, S., MIKAMI, B., MARUYAMA, N. Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1. In: *Mol. Immunol.*, 2011, vol. 49, p.115-123. ISSN 0161-5890
17. SHUTOV, A.D., KAKHOVSKAYA, I.A., BASTRYGINA, A.S., BULMAGA, V.P., HORSTMANN, C., MUNTZ, K. 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, vol.241, p.221-228. ISSN 1742-464X
18. WICHERS, H.J., DE BEYER, T., SAVELKOUL, 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, vol.52, p.4903-4907. ISSN 0021-8561
19. SHUTOV, A.D., RUDAKOVA, A.S., RUDAKOV, S.V., KAKHOVSKAYA, I.A., SCHALLAU, A.A., WILSON, K.A., MARUYAMA, N. Degradation of β -conglycinin β -homotrimer by papain: independent occurrence of limited and extensive proteolyses. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2013, vol.77, p.2082-2086. ISSN: 1347-6947 (online version), ISSN: 0916-8451 (print version).

Prezentat la 21.10.2016