



În timpul proteolizei limitate a globulinei 11S din soia [6] și dovleac [7] cu papaină regiunea nestructurată *a* rămâne intactă, dar este scindată regiunea C-terminală extinsă a  $\alpha$ -catenelor, ce cuprinde sectoarele nestructurate *b* și *c* și regiunea  $\alpha$ -helix – stredul J' (Fig.1). Rezultatele studierii proteolizei limitate a globulinei 11S din arahide cu papaină [2] indică scindarea probabilă în toate cele trei sectoare nestructurate ale  $\alpha$ -catenelor (*a*, *b* și *c*). Compoziția fragmentelor rezultate este destul de complexă, ceea ce face dificilă identificarea legăturilor peptidice scindate în această proteină de papaină cu o specificitate relativ joasă. În studiul de față am investigat proteoliza limitată a globulinei 11S din arahide cu tripsina cu o specificitate îngustă. Rezultatele indică în mod clar că sub acțiunea tripsinei are loc scindarea regiunii C-terminale a  $\alpha$ -catenelor, în care sunt trei dintre cei patru determinanți antigenici (epitopi IgE), identificați în subunitățile globulinei 11S din arahide (Fig.1).

### Material și metode

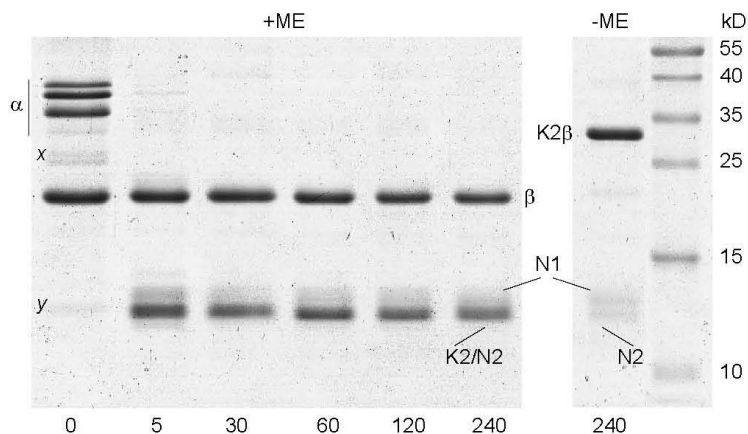
Izolarea globulinei 11S din cotiledoanele arahidelor (*Arachis hypogaea* L.) a fost realizată așa cum a fost descris anterior [2]. Globulina 11S a fost hidrolizată cu tripsină (Sigma Life Science) la 30°C. Amestecul de reacție a conținut 5 mg/ml substrat și 5  $\mu$ g/ml enzimă în tampon B (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, ajustat cu NaCl până la tăria ionică 0,5, conținând 0,02%  $\text{NaN}_3$  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.

### Rezultate și discuții

În conformitate cu rezultatele obținute anterior [2], SDS-PAGE, în prezența ME a preparatului purificat al globulinei 11S din arahide (Fig.2), relevă trei benzi majore și o bandă minoră cu masele moleculare aparente apropiate de cele calculate pentru cele patru variante principale ale  $\alpha$ -catenelor acestei proteine.  $\beta$ -catenele diferitelor subunități ale Ara h3 diferă puțin una de alta după masa moleculară și formează doar o singură bandă electroforetică. Zonele minore x și y corespund impurităților din preparatul purificat al globulinei 11S [2].

Hidroliza globulinei 11S cu tripsină are loc suficient de rapid și după 5 min la raportul enzimă/substrat 1:1000 se observă formarea produsului, care în continuare rămâne practic neschimbat (Fig.2), constituit din  $\beta$ -catenele intacte și trei fragmente ale  $\alpha$ -catenelor cu masele moleculare aparente de 13,3 kDa (fragmentul N1) și 12,7 kD (fragmentele N2 și K2). Compararea rezultatelor SDS-PAGE ale produselor proteolizei în prezența și absența ME (+ME și -ME, respectiv, Fig.2) indică existența a două tipuri de fragmente ale  $\alpha$ -catenelor. Comportamentul fragmentelor N1 și N2 nu depinde de prezența sau absența ME; ele sunt reținute în molecula de proteină parțial hidrolizată numai datorită interacțiunilor necovalente. Fragmentul K2, legat printr-o legătură disulfidică cu  $\beta$ -catena, și în absența ME formează zona K2 $\beta$  (Fig.2).

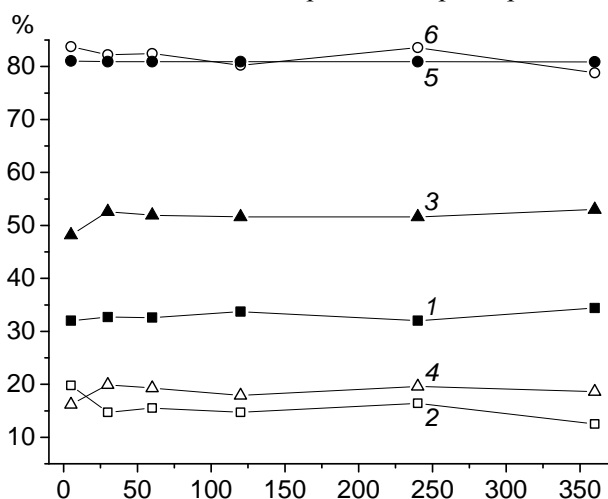


**Fig.2.** SDS-PAGE în prezența (+ME) și absența (-ME) 2-mercaptoetanolului globulinei 11S din arahide în timpul proteolizei cu tripsină. Rândul de jos arată timpul de reacție (min). Pe dreapta sunt indicate masele moleculare ale proteinelor markeri.

După cum s-a menționat mai sus, în componența moleculei heterohexamerică a globulinei 11S din arahide intră opt tipuri de subunități, similare după structura primară. Evident, fiecare dintre fragmentele N1, N2 și K2 este eterogen; fiecare dintre ele aparține regiunilor omoloage, dar neidentice, ale secvențelor diferitelor subunități.

În timpul proteolizei, conținutul relativ al  $\beta$ -catenelor intacte, exprimat în procente molare, este constant (Fig.3, 1) și reprezintă o treime ( $32.9 \pm 0.9\%$ ) din suma a trei componente, detectate la SDS-PAGE (Fig.2): fragmentele N1 (Fig.3, 2), fragmentele K2/N2 (Fig.3, 3), și  $\beta$ -catenele. Evident, fragmentele K2 după conținutul relativ (în procente molare) nu diferă de  $\beta$ -catenele, cu care sunt legate printr-o legătură disulfidică. De aceea, conținutul relativ al fragmentelor N2 (în procente molare (Fig.3, 4) este egal cu diferența dintre conținutul sumar al fragmentelor K2 și N2 (Fig.3, 3), care formează o bandă comună (Fig.2, +ME) și  $\beta$ -catene (Fig.3, 1). Conform acestei scheme, produsul proteolizei limitate a globulinei 11S cu tripsină constă din cantitățile echimolare a trei componente –  $\beta$ -catenele intacte, fragmentele K2 și suma fragmentelor N1 și N2. Așa cum se arată mai jos, fragmentele N1 și N2 (Fig.2) se formează prin proteoliza a două tipuri de subunități ale globulinei 11S din arahide, ce diferă doar puțin după structura primară.

Masa moleculară medie a produsului cu masa moleculară mare a tripsinolizei globulinei 11S, calculată ca suma maselor  $\beta$ -catenelor, fragmentului K2 și masa moleculară medie a fragmentelor N1 și N2 este constantă și alcătuiește  $80,9 \pm 0,1\%$  (Fig.3, 5) din masa moleculară inițială a proteinei (ultima calculată ca suma maselor  $\beta$ -catenelor și masa moleculară medie a tuturor celor opt variante principale ale  $\alpha$ -catenelor [2]).



**Fig.3.** Analiza cantitativă a proteolizei globulinei 11S din arahide cu tripsină. Abscisa – timpul de reacție (min).

Ordonata – conținutul, în procente molare, al produselor polipeptidice ale reacției (1-4) și masa moleculară a subunităților în procente din cea inițială (5, 6). 1 –  $\beta$ -catenele intacte; 2 – fragmentul N1; 3 – suma fragmentelor N2 și K2; 4 – fragmentul N2; 5 și 6 – masa moleculară a subunităților, calculată după conținutul relativ în procente molare al masei moleculare a polipeptidelor proteinei inițiale și amestecului de reacție (5) și după modificarea conținutului relativ al  $\beta$ -catenelor în timpul reacției (6).

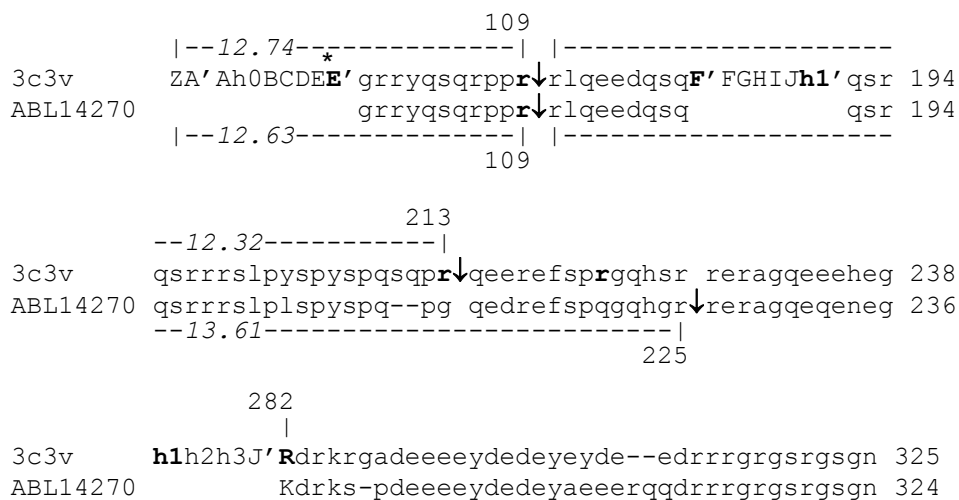
În timpul proteolizei limitate a globulinei 11S  $\beta$ -catenele rămân intacte. Acest lucru dă posibilitatea de a determina modificarea masei moleculare relative a subunităților în timpul reacției printr-o metodă alternativă independentă [6]. În acest caz,  $M^t/m^0 = P_\beta^0/P_\beta^t$ , unde  $m^0$  și  $M^t$  – masa moleculară inițială și după timpul de reacție  $t$ , respectiv;  $P_\beta^0$  și  $P_\beta^t$  – conținutul masic relativ al  $\beta$ -catenelor în amestecul de reacție inițial și după timpul de reacție  $t$ , respectiv. Astfel calculată masa moleculară relativă a proteinei reziduale în limita erorii este constantă ( $81,8 \pm 1,8\%$ ) (Fig.3, 6) și apropiată de valoarea obținută prin metoda anterioară ( $80,9 \pm 0,1\%$ ). Aceasta confirmă compoziția polipeptidică a subunităților globulinei 11S după finisarea proteolizei limitate descrisă mai sus.

Rezultatele de mai sus, împreună cu informația descrisă anterior privind prezența în structura moleculei Ara h3 a zonelor potențial sensibile la atacul proteolitic [2], permit identificarea celor mai probabile puncte de clivaj ale  $\alpha$ -catenelor globulinei 11S din arahide. Jumătatea N-terminală a  $\beta$ -barrelului, care conține cisteina, implicată în formarea legăturii disulfidice între  $\alpha$ - și  $\beta$ -catene (Fig.4), conservativă în structura primară a subunităților globulinei 11S din arahide și alte globuline 11S, nu conține resturi de aminoacizi cu o accesibilitate

crescută la solvent și, prin urmare, nu este sensibilă la proteoliza limitată. Evident, fragmentul K2, legat covalent cu  $\beta$ -catenele, aparține jumătății N-terminale a  $\beta$ -barrelului și se formează în rezultatul scindării în regiunea inserției hidrofile nestructurate (Fig.1), potențial sensibilă la atacul proteolitic în structura Ara h3 [2] și a altor globuline 11S [3, 9]. E destul de probabil că fragmentul K2 se formează prin clivarea legăturii peptidice r109-r110 (Fig.4), deoarece masa sa moleculară aparentă, conform datelor SDS-PAGE (12,7 kD), coincide cu masa care corespunde regiunii N-terminale a tuturor celor opt variante principale [2] de subunități ale globulinei 11S din arahide (12,69±0,06 kD).

În numeroase studii [3, 9] se arată că proteoliza globulinei 11S din semințele germinate și *in vitro* începe cu scindarea C-terminală a inserției hidrofile nestructurate *c* (Fig.1). E destul de probabil că globulina 11S din arahide nu este diferită după acest caracter de celelalte globuline 11S: în structura model a hexamerului Ara h3 [4], unicul rest de aminoacid cu o accesibilitate relativă la solvent mai mare de 100% este Arg282, ce aparține  $\beta$ -strendului J' (Fig.4). Menționăm că regiunea corespunzătoare este aproape identică (doar tolerează substituțiile conservative Arg/Lys) în secvențele tuturor subunităților globulinei 11S din arahide [4].

Fenomenul formării fragmentelor N1 și N2, care se deosebesc după masa moleculară a produselor finale ale proteolizei limitate a subunităților înalt conservative ale globulinei 11S din arahide, poate fi ilustrat prin compararea secvențelor  $\alpha$ -catenelor ale subunităților 3c3v și ABL14270 (Fig.4).



**Fig.4.** Schema secvențelor  $\alpha$ -catenelor în subunitățile 3c3v și ABL14270 ale globulinei 11S din arahide. Sunt arătate structurile secundare în  $\alpha$ -catena subunității pdb|3c3v și în  $\alpha$ -catenele ambelor subunități – secvențele complete de aminoacizi (cu litere mici), potențial sensibile la proteoliză, ale inserțiilor hidrofile *a* (între  $\beta$ -strendurile E' și F'), *b* (între  $\alpha$ -helixurile h1' și h1) și *c* (regiunea C-terminală). Asterixul marchează poziția resturilor de cisteină implicate în formarea legăturii disulfidice între  $\alpha$ - și  $\beta$ -catene. Cu bold sunt evidențiate: structurile secundare care limitează sectoarele nestructurate *a* și *b*; resturile de aminoacizi care corespund specificității tripsinei, pentru care este arătată o accesibilitate crescută la solvent (> 80%) în structura model a hexamerului 3c3v [4]. Săgețile corespund celor mai probabile puncte de scindare ale  $\alpha$ -catenelor. Italic sunt arătate masele moleculare ale fragmentelor (kD), calculate după segmentul corespunzător al secvenței (numerotarea resturilor de aminoacizi corespunde subunităților mature ale moleculei).

După îndepărtarea C-terminală a sectorului *c* al subunităților 3c3v și ABL14270 și scindarea legăturii r109-r110, în secvențele reziduale ale acestor subunități rămâne numai inserția hidrofila extinsă *b* potențial sensibilă la proteoliză (Fig.4). În subunitatea 3c3v în partea centrală a inserției *b* este prezent restul r213 cu o accesibilitate crescută la solvent (> 80%). Scindarea legăturii corespunzătoare (r213-q214) este posibilă, deoarece masa moleculară a segmentului r110-r213 al secvenței 3c3v (12,32 kDa) și a fragmentului N2 (12,7 kD conform datelor SDS-PAGE) sunt apropiate.

Structurile primare (evident, și cele secundare) ale subunităților 3c3v și ABL14270 diferă puțin una de alta. Cu toate acestea, în subunitatea ABL14270 în regiunea centrală a inserției *b* restul Arg (r213 în subunitatea 3c3v) este înlocuit cu restul Gly (Fig.4). În acest sens, punctul de scindare al secvenței ABL14270, cel mai probabil, este deplasat, ceea ce duce la formarea fragmentului N1 (r110-r225), cu masa moleculară de 13,61 kD (13,3 kD conform datelor SDS-PAGE).

Conform scenariului descris, produsul final al proteolizei limitate a globulinei 11S din arahide duce la distrugerea rapidă (până la formarea produselor care nu sunt detectabile prin electroforeză) a întregii regiuni C-terminale a  $\alpha$ -catenelor, inclusiv a  $\alpha$ -helixurilor h1, h2 și h3. Această regiune cuprinde trei dintre cei patru epitopi IgE identificați în secvențele de aminoacizi ale Ara h3 [5]. Astfel, proteoliza limitată cu tripsină duce la o reducere substanțială a nivelului de alergenicitate a globulinei 11S din arahide.

#### Referințe:

1. 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
2. CHERDIVARĂ, A., RUDACOVA, A., RUDACOV, S., ȘUTOV, A. Alergenul Ara h3, globulina de rezervă 11S, din semințele de arahide. 1. Proteoliza limitată cu papaină. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2017, nr.1(101), sub tipar. ISSN 1814-3237
3. 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, vol. 80, p.1354-1361. ISSN 0006-2979
4. 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
5. 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
6. 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
7. RUDAKOVA, A.S, RUDAKOV, S.V, KAKHOVSKAYA, I.A, SHUTOV, A.D. 11S storage globulin from pumpkin seeds: regularities of proteolysis by papain. In: *Biochemistry (Moscow)*, 2014, vol.79, p.820-825. ISSN 0006-2979
8. 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
9. 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 24.04.2017