

UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 577.1./2(043)

CHERDIVARĂ Ala

**GLOBULINELE DE REZERVĂ 7S ȘI 11S DIN SEMINȚE:
EVOLUȚIE, PROTEOLIZĂ, ALERGENICITATE**

163.02. Biochimie

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2020

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Cercetări Științifice „Biochimia Plantelor” al
Universității de Stat din Moldova

Conducător științific:

ȘUTOV Andrei, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

Referenți oficiali

ROTARI Alexandru, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

PORT Angela, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Componența consiliului științific specializat:

DASCALIUC Alexandru, *președinte*, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

CAUȘ Maria, *secretar științific*, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

LEȘANU Mihai, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

GLIJIN Aliona, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Susținerea tezei va avea loc la **04 decembrie 2020, ora 14** în ședința Consiliului Științific Specializat **D 163.02-26** din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor. MD 2002, str. Pădurii 20, or. Chișinău, Republica Moldova, tel.: +37322770447, fax.: +37322556180, e-mail: institut.gfpp@gmail.com.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la Biblioteca Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor și la pagina web a ANACEC. (<http://www.cnaa.md/>).

Rezumatul a fost expediat la **02 noiembrie 2020**

*Secretarul științific al Consiliului
Științific Specializat*



CAUȘ Maria
dr. în șt. biol., conf. cercet.

Conducător științific



ȘUTOV Andrei,
dr. hab. în șt. biol., prof. univ.

Autor



CHERDIVARĂ Ala

© Cherdivară Ala, 2020

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE TEZEI	4
CONȚINUTUL TEZEI	7
1. GLOBULINELE DE REZERVĂ DIN SEMINȚE	7
1.1. Structura și proteoliza globulinelor de rezervă din semințe	7
1.2. Evoluția globulinelor de rezervă din semințe	7
1.3. Globulinele de rezervă din semințe ca alergeni	8
2. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA STRUCTURILOR GLOBULINELOR DE REZERVĂ DIN SEMINȚE	8
2.1. Metodele și strategia de cercetare	8
2.2. Analiza originii și evoluției globulinelor de rezervă	9
2.3. Succesiunea formării structurilor globulinelor 7S și 11S	11
3. LEGITĂȚILE PROTEOLIZEI GLOBULINEI 11S DIN SEMINȚELE DE GINKGO	12
3.1. Materialul și metodele de cercetare	12
3.2. Proteoliza ginnacinei, globulina 11S din semințele de ginkgo	13
3.3. Cinetica proteolizei ginnacinei	13
3.4. Modelul structural al ginnacinei	14
4. PROTEOLIZA CA MODALITATE DE REDUCERE A ALERGENICITĂȚII GLOBULINELOR DE REZERVĂ DIN ARAHIDE	18
4.1. Materialul și metodele de cercetare	18
4.2. Legitățile proteolizei limitate cu tripsină a globulinei 11S din arahide	18
4.3. Posibilități de reducere a alergenicității globulinei 11S prin proteoliză	21
4.4. Legitățile proteolizei limitate cu papaină a globulinei 7S din arahide	21
4.5. Posibilități de reducere a alergenicității globulinei 7S prin proteoliză	23
4.6. Imunoreactivitatea încrucișată a globulinelor de rezervă	24
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI	25
BIBLIOGRAFIE	26
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI	29
ADNOTĂRI (română, engleză, rusă)	31

REPERELE CONCEPTUALE ALE TEZEI

Actualitatea și importanța temei abordate. Semințele sunt o sursă importantă de proteine alimentare. Conform datelor Organizației pentru Alimentație și Agricultură a ONU (FAO – Food and Agriculture Organization) rația alimentară a oamenilor la nivel mondial conține 70% proteine vegetale și doar 30% – proteine animale. Partea principală a proteinelor vegetale alimentare sunt proteinele de rezervă din semințe. Numărul mare de proteine de rezervă din semințe este inclus în două familii – globuline 7S (viciline) și globuline 11S (legumine).

Globulinele 7S și 11S reprezintă o rezervă de proteine macromoleculare, formată în timpul maturării semințelor și mobilizată pentru nutriția răsadului la sfârșitul unei perioade îndelungate de odihnă. În ciuda primitivității aparente a funcției, globulinele de rezervă din semințele tuturor spermatofitelor sunt foarte conservative, ceea ce indică condiționalitatea funcțională a structurii lor. Spre deosebire de alte proteine din semințe, al căror metabolism constă în sinteză și degradare, care decurg paralel, la globulinele de rezervă 7S și 11S aceste procese sunt separate în timp. Prin urmare, structura globulinelor de rezervă formată pe parcursul evoluției este protejată în semințele germinative de degradarea prematură și dobândește capacitatea de a regla mobilizarea proteolitică în timpul germinării semințelor și dezvoltării răsadului.

Componența aminoacidică și proprietățile funcționale ale globulinelor de rezervă native din semințe sunt departe de a fi întotdeauna satisfăcătoare, ceea ce limitează utilizarea directă a acestora în produsele alimentare și ca componente ale formelor artificiale bogate în proteine. Mai mult decât atât, conform SDAP (baza de date structurale a proteinelor alergene) globulinele de rezervă din semințele multor plante sunt alergeni. Încercările de a utiliza metodele ingineriei genice pentru îmbunătățirea proprietăților nutriționale și funcționale ale globulinelor de rezervă, precum și pentru a reduce alergenicitatea lor, nu pot avea succes decât dacă nu încalcă baza fiziologică a funcționării lor în timpul maturării și germinării semințelor. Soluția acestei probleme ar trebui să se axeze pe rezultatele studiului privind legăturile de formare a structurilor conservative ale globulinelor 7S și 11S în timpul evoluției lor, precum și pe mecanisme care reglează degradarea globulinelor de rezervă în timpul germinării semințelor.

Scopul lucrării. Studiarea legăturilor formării structurii conservative a globulinelor de rezervă din semințe în timpul evoluției, stabilirea mecanismului degradării proteolitice profunde a acestora și analiza perspectivelor de utilizare a proteolizei limitate a globulinelor de rezervă pentru a reduce nivelul de alergenicitate a acestora.

Obiectivele cercetării au constat în:

- analiza relațiilor filogenetice dintre globulinele de rezervă din semințe și proteinele structural omoloage ale procariotelor și eucariotelor;
- stabilirea etapelor succesive în formarea structurii globulinelor de rezervă, care determină funcția lor în semințe;
- studierea cineticii proteolizei globulinei de rezervă 11S din semințele de ginkgo *Ginkgo biloba* unul dintre cei mai vechi reprezentanți ai spermatofitelor și descrierea mecanismului de reglare a degradării lor proteolitice profunde;
- studierea reacțiilor succesive a proteolizei limitate ale globulinelor 11S și 7S din arahide *Arachis hypogaea*, semințele cărora au un nivel ridicat de alergenicitate;
- stabilirea modificărilor structurale în globulinele 11S și 7S în timpul proteolizei și analiza posibilității de reducere a alergenicității globulinelor de rezervă din arahide prin proteoliza limitată.

Ipoteza de cercetare:

1. Evoluția globulinelor de rezervă și a germinelor/sferulinelor a avut loc după două scenarii independente. Precursorii evolutivi ai globulinelor de rezervă din semințe pot fi oxalat-decarboxilazele bacteriene.

2. Proteoliza limitată a leguminei din ginkgo inițiază degradarea profundă a acesteia prin mecanismul „una câte una”. Mecanismul de reglare a degradării proteolitice masive a globulinelor de rezervă, care a apărut la un nivel atât de timpuriu de dezvoltare a structurilor primare și superioare ale globulinelor de rezervă ca Gingkophyta, s-a păstrat în timpul evoluției ulterioare a structurilor globulinelor din familia leguminelor.

3. Proteoliza limitată a leguminei și a vicilinei din arahide duce la eliminarea sectoarelor secvențelor de aminoacizi în care sunt identificați epitopii IgE, care determină alergenicitatea acestor proteine. Proteoliza limitată poate fi recomandată ca o modalitate de a reduce nivelul de alergenicitate a globulinelor de rezervă din semințele de arahide, soia și alte plante utilizate în alimentație.

Sinteza metodologiei de cercetare. În conformitate cu scopul și obiectivele trasate, în vederea demonstrării ipotezelor de cercetare înaintate, au fost aplicate metode de cercetare clasice și moderne.

La analiza structurilor primare și superioare ale proteinelor au fost utilizate metode moderne, furnizate de următoarele programe internaționale: BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/>) – pentru a identifica secvențele omoloage de aminoacizi ale proteinelor; Clustal W2 și Clustal Omega – pentru alinierea (alignment) secvențelor de aminoacizi găsite ale proteinelor; TREECON – pentru analiza evolutivă a proteinelor găsite; DeepView Swiss-PDB Viewer – pentru analiza structurilor terțiare ale proteinelor, construirea diagramelor panglică și alinierea structurală; Swiss Model – pentru a construi structurile terțiare și cuaternare model ale proteinelor studiate; programul <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/> – pentru a determina suprafața resturilor de aminoacizi accesibilă la solvent în structurile de cristal și model ale oligomerilor globulinelor 11S.

Extragerea și purificarea proteinelor studiate a fost efectuată prin fracționarea cu sulfat de amoniu și cromatografia hidrofobă pe coloana cu phenil-Sepharose CL-4B. Determinarea purității preparatelor proteice obținute, precum și identificarea produselor de proteoliză a fost realizată prin SDS-electroforeză.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducere** se argumentează actualitatea și importanța temei abordate, sunt formulate scopul și obiectivele lucrării, se prezintă ipoteza de cercetare, sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese, precum și sumarul capitolelor tezei.

1. GLOBULINELE DE REZERVĂ DIN SEMINȚE

1.1. Structura și proteoliza globulinelor de rezervă din semințe

S-a stabilit că baza structurală a subunităților globulinelor de rezervă 11S și 7S din semințe este β -barrel-ul, conectat la un grup de α -helixuri. Secvențele de aminoacizi ale globulinelor de rezervă din afara modulului structural β -barrel- α -helixuri conțin inserții nestructurate extinse cu sensibilitate crescută la atacul proteolitic. Aceste inserții determină legițile proteolizei limitate site-specifice ale globulinelor de rezervă observate în semințele germinate și *in vitro* [1]. S-a arătat că degradarea masivă a globulinelor 11S din soia [2] și din dovleac [3], care se desfășoară ca o reacție de ordinul pseudo-unu, începe numai după finalizarea proteolizei limitate anterioare. Evident, în timpul proteolizei limitate, apar modificări structurale în globulinele de rezervă, care expun legăturile peptidice mascate în structura lor nativă [1]. Natura acestor modificări, care conferă globulinelor de rezervă capacitatea de degradare profundă, nu este descrisă. Rolul proteolizei limitate în inițierea degradării masive a globulinelor 11S a fost stabilit în mod credibil pentru globulinele din semințele a numai două plante (soia și dovleac). Nu este clar în ce măsură acest rol este caracteristic întregii familii de globuline 11S.

1.2. Evoluția globulinelor de rezervă din semințe

S-a revizuit informația despre proteinele, care formează superfamilia globulinelor de rezervă 7S (viciline) și globulinelor de rezervă 11S (legumine) din semințe: globulinele de rezervă propriu-zise; proteinele vicilino- și legumino-similare din plantele cu spori *Selaginella moellendorffii* și *Matteuccia struthiopteris*; proteinele din alga verde *Coccomyxa subellipsoidea*; oxalat-decarboxilazele bacteriene; germinele din semințe și proteine germino-similare; sferulinele din *Amoebozoa* și proteinele sferulino-similare [1, 4]. Proteinele enumerate sunt înrudite cu globulinele de rezervă din semințe la nivelul structurilor primare, terțiare și cuaternare. Precursori străvechi evolutivi ai globulinelor de rezervă din semințe pot fi fie sferulinele din *Amoebozoa* [5-7], fie oxalat-decarboxilazele bacteriene [8-10]. Încercările analizei evolutive a proteinelor superfamiliei globulinelor de rezervă au lăsat deschisă problema originii globulinelor de rezervă [1, 11].

1.3. Globulinele de rezervă din semințe ca alergeni

În semințele multor plante de cultură, utilizate în alimentație, globulinele de rezervă 7S și 11S sunt alergene (conform datelor SDAP, Structural Database of Allergenic Proteins) [12]. În unele dintre ele (inclusiv în globulinele de rezervă din semințele de arahide, care sunt caracterizate printr-un nivel crescut de alergenicitate [13]), au fost identificați determinanți antigenici (epitopii IgE) responsabili de legarea IgE [14-16]. Este caracteristic faptul că mulți dintre acești epitopi IgE aparțin regiunilor secvențelor globulinelor de rezervă cu sensibilitate crescută la atacul proteolitic. Aceasta arată posibilitatea fundamentală de a reduce alergenicitatea globulinelor de rezervă din semințe prin proteoliza limitată, în care structura restului de proteină rămâne neschimbată. Cu toate acestea, nu s-au efectuat studii în această direcție.

2. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA GLOBULINELOR DE REZERVĂ DIN SEMINȚE

2.1. Metodele și strategia de cercetare

Următoarea strategie a fost utilizată pentru a identifica predecesorii străvechi evolutivi ai globulinelor de rezervă din semințe și pentru a descrie etapele succesive ale evoluției lor. Folosind programul BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (instrument de bază de căutare a alinierii locale) <http://www.ncbi.nih.gov/>), s-a format *in silico* o vastă colecție de secvențe de aminoacizi omoloage ale proteinelor din superfamilia globulinelor de rezervă din semințe: globulinelor de rezervă propriu-zise, proteinelor din plantele cu spori și din algele verzi, oxalat-decarboxilazelor bacteriene, precum și germinelor și sferulinelor și proteinelor înrudite cu ele din plante și din eucariotele inferioare.

A fost efectuată alinierea multiplă a secvențelor de aminoacizi ale proteinelor superfamiliei globulinelor de rezervă (programele Clustal W2 și Clustal Omega) și pe baza ei s-a construit arborele fără rădăcină (programul TREECON), care descrie relațiile filogenetice dintre proteinele studiate.

Ultima etapă din strategia de cercetare a evoluției globulinelor de rezervă (alegerea secvenței de aminoacizi a unei proteine adecvate ca rădăcină) este cea mai critică, deoarece rezultatele analizei originii globulinelor de rezervă depind în primul rând de aceasta. În arborele fără rădăcină, care reunește colecția selectată de proteine studiate, oxalat-decarboxilaza cam64834 din actinobacteria *Mycobacterium abscessus* prezintă asemănări cu oxalat-decarboxilazele din proteobacterii și cianobacterii. Cu toate acestea, însă, secvența completă a cam64834, dincolo de modulul structural β -barrel- α -helixuri, este omologă cu sferulinele

monodomenice din *Amoebozoa*. Prin urmare, secvența de aminoacizi a acestei proteine, care reflectă trăsăturile străvechi atât ale oxalat-decarboxilazelor, cât și ale sferulinelor [11], poate fi utilizată ca rădăcină în construirea arborelui evolutiv, care descrie originea și evoluția globulinelor de rezervă din semințe.

2.2. Analiza originii și evoluției globulinelor de rezervă

Globulinele de rezervă și germinale/sferulinele formează două ramuri evolutive independente, care provin din oxalat-decarboxilaza monodomenică cam64834 din actinobacteria *Mycobacterium abscessus* (Figura 2.1.). Evoluția germinelor a avut loc conform scenariului divergent clasic (Bacteria, Amoebozoa, Stramenopiles, Chlorophyta, Bryophyta, Lycopodiophyta, Pinophyta, Magnoliophyta).

Dimpotrivă, pe ramura evolutivă a globulinelor de rezervă, nu există proteinele bidomenice ale eucariotelor inferioare ca legături intermediare între oxalat-decarboxilazele bacteriene (OD) și proteinele OD-similare din alga verde *Coccomyxa subellipsoidea* (încrângătura Chlorophyta). Existența genelor *Coccomyxa subellipsoidea* care codifică proteinele OD-similare poate fi considerată o bună ilustrare a implicării mecanismului transferului orizontal de gene în evoluția globulinelor de rezervă din semințe.

Următoarea informație detaliază calea evolutivă a globulinelor de rezervă din semințe. În genomul *Selaginella moellendorffii* (struțșor) și *Amborella trichopoda* (grupul bazal al Magnoliophyta) există gene care codifică toate cele patru tipuri de proteine omoloage cu legumina și vicilina: proteine vicilino-similare, proteine legumino-similare, germinale și proteine germino-similare (Figura 2.1).

Este foarte probabilă prezența în genomurile algelor verzi ale genelor care codifică proteinele vicilino și/sau legumino-similare, care sunt precursorii proteinelor respective din plantele cu spori. Însă, până la data publicării articolului nostru, care descrie topologia arborelui evolutiv al globulinelor de rezervă [17], această informație lipsea. Abia la sfârșitul lunii mai 2017, a fost raportată informația despre genomul algei verzi *Klebsormidium nitens* din încrângătura Charophyta, care este o legătură intermediară între algele verzi și plantele terestre [18]. Printre proteinele din *Klebsormidium nitens* BLAST căutarea, a dezvăluit cel puțin patru secvențe de aminoacizi conservative ale proteinelor bidomenice (gaq91246, gaq85384, gaq84499 și gaq84498), omoloage cu leguminele din semințe și, prin urmare, cu proteinele legumino-similare din struțșor *Selaginella moellendorffii* (Figura 2.1).

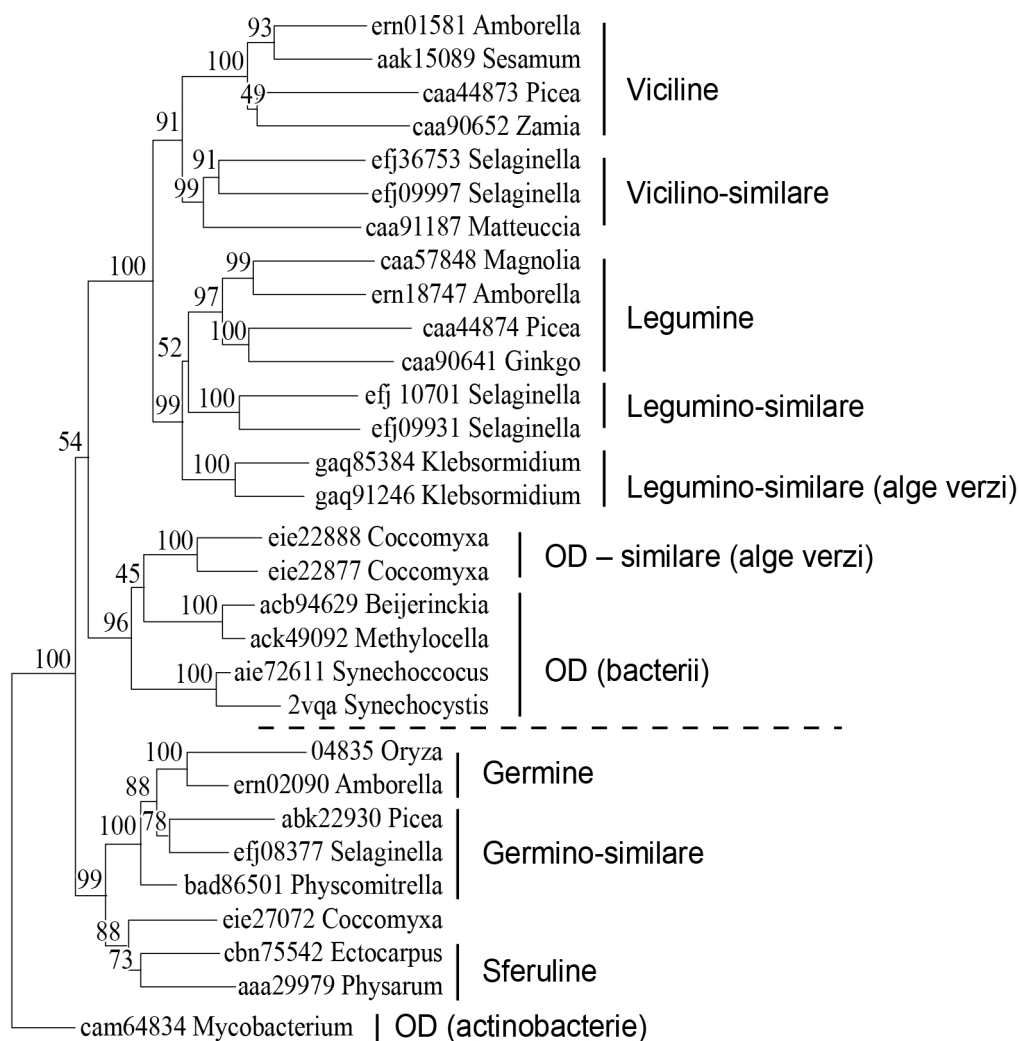


Fig. 2.1. Căile independente ale evoluției globulinelor de rezervă și germinelor/sferulinelor OD – oxalat-decarboxilaze. Regiunile secvențelor, utilizate pentru analiză, corespund domeniilor C-terminale ale proteinelor bidomenice (deasupra liniei punctate) și domeniului proteinelor monodomenice (172 poziții ale alinierii multiple, care cuprind modulul structural β -barrel- α -helixuri). Numerele de deasupra ramurilor reflectă suportul statistic al clusterelor (% din 1000 de replicări).

Conform rezultatelor modelării (programul Swiss Model), în proteina gaq91246 din alga verde *Klebsormidium nitens* sunt prezente două domenii, care formează practic toate structurile secundare caracteristice leguminelor. În structura cuaternară model subunitățile proteinei gaq91246 din alga verde *Klebsormidium nitens*, precum și subunitățile globulinelor 11S din semințe și oxalat-decarboxilazelor bacteriene, sunt combinate în trimeri.

Pe baza analizei structurilor primare ale proteinelor omoloage din plante și bacterii, ipoteza despre originea globulinelor de rezervă din semințe din oxalat-decarboxilazele bacteriene bidomenice (Figura 2.1) este confirmată de suprapunerea spațială a structurilor secundare, terțiare și cuaternare ale acestor proteine.

2.3. Succesiunea de formare a structurilor globulinelor 7S și 11S

Structura cristalină a oxalat-decarboxilazei cianobacteriene 2vqa (Figura 2.1), care este un precursor bidomenic comun al leguminelor și vicilinelor cu structurile terțiare și cuaternare cunoscute, poate fi utilizată ca rădăcină pentru a stabili antichitatea relativă a structurilor superioare ale leguminelor și vicilinelor. Conform rezultatelor suprapunerii spațiale a structurilor terțiare ale subunităților (programul DeepView/Swiss-PDB Viewer), leguminele sunt semnificativ mai apropiate de oxalat-decarboxilaza 2vqa, decât vicilinele (Figura 2.2). Antichitatea relativă nu numai a structurilor terțiare, dar și a structurilor primare ale leguminelor este relevată de rezultatele alinierii structurale a secvențelor de aminoacizi ale subunităților oxalat-decarboxilazei 2vqa și ale subunităților globulinelor de rezervă 11S și 7S (Figura 2.2). Această concluzie este confirmată de absența genelor care codifică proteinele vicilino-similare în genomul *Klebsormidium nitens*. Astfel, divergența ramurii evolutive a globulinelor de rezervă din semințe în clustere independente de proteine legumino-similare și vicilino-similare s-a produs la nivelul plantelor cu spori (Figura 2.1).

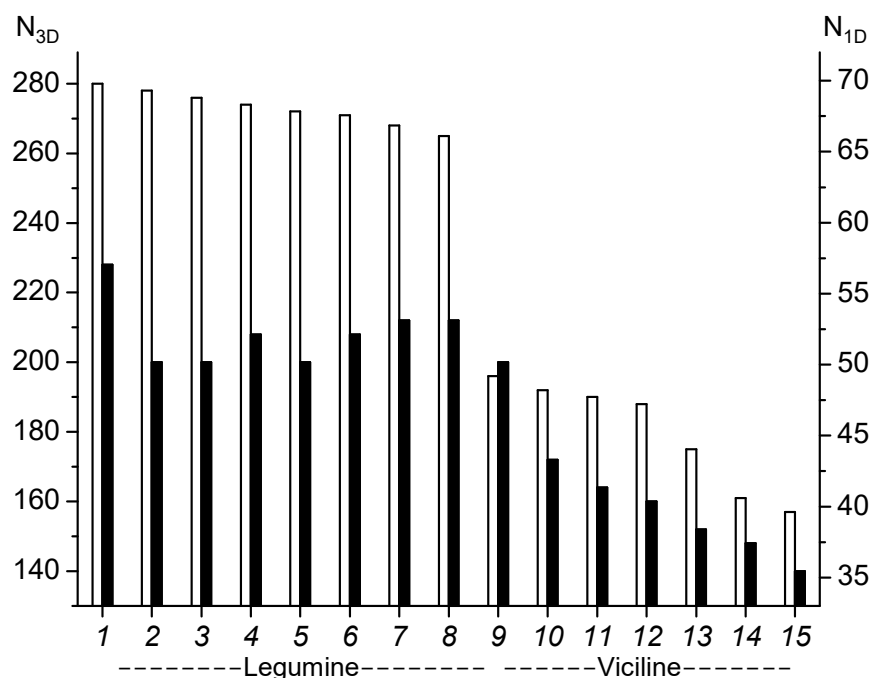


Fig. 2.2. Compararea structurilor terțiare (coloane albe) și primare (coloane negre) a subunităților globulinelor de rezervă și oxalat-decarboxilazei 2vqa din cianobacterii *Synechocystis* sp.

N_{3D} – numărul atomilor C^α ale resturilor de aminoacizi, care coincid după poziție la suprapunerea spațială a structurilor terțiare ale subunităților. N_{1D} – numărul resturilor de aminoacizi identici în secvențele subunităților aliniate structural. Legumine – 1fxz (1) și 3d5h (5) *Glycine max*; 3ksc (2) *Pisum sativum*; 2e9q (3) *Cucurbita maxima*; 3fz3 (4) *Prunus dulcis*; 3qac (6) *Amaranthus hypochondriacus*; 3c3v (7) *Arachis hypogaea*; 3kgl (8) *Brassica napus*. Viciline – 4lej (9) *Pinus koraiensis*; 2cv6 (10) *Vigna radiata*; 1ipk (11) și 1uik (13) *Glycine max*; 2cau (12) *Canavalia ensiformis*; 2phl (14) *Phaseolus vulgaris*; 3smh (15) *Arachis hypogaea*

O diferență semnificativă între proteinele legumino-similare din *Klebsormidium nitens* și din *Selaginella moellendorffii* și globulinele 11S din semințe este prezența în ultimele a trei regiuni extinse nestructurate în structura domeniilor N-terminale. Aceste bucle, precum și linkerul alungit între domenii, formează straturi hidrofile de suprafață în structura globulinelor 11S, care sunt sensibile la atacul proteolitic.

3. LEGITĂȚILE PROTEOLIZEI GLOBULINEI 11S DIN SEMINȚELE DE GINKGO

S-a stabilit că proteoliza limitată a globulinelor de rezervă 11S din soia și dovleac este o etapă necesară, ce precede degradarea masivă a acestor proteine [2, 3]. Astfel, globulinele 11S din semințele acestor plante sunt protejate de degradarea profundă prematură. A apărut oare rolul respectiv de reglare al proteolizei limitate a globulinelor 11S la un nivel evolutiv atât de timpuriu ca Ginkgophyta? Pentru a răspunde la această întrebare, a fost realizat un studiu al mecanismului de proteoliză al ginnacinei, globulina de rezervă 11S din semințe de ginkgo, cu papaină, precum și analiza tuturor structurilor cristaline cunoscute ale globulinelor 11S, în comparație cu structura model a ginnacinei.

3.1. Materialul și metodele de cercetare

Pentru purificarea ginnacinei din semințele de ginkgo *Ginkgo biloba*, s-a utilizat salifierea cu sulfatul de amoniu, cromatografia pe fenil-sefaroză CL-4B (Pharmacia Biotech, Suedia) și gelfiltrarea pe Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech, Suedia). Ginnacina a fost hidrolizată cu papaină (amestecul de reacție conținea 5 mg/ml substrat și 100 μg/ml papaină) (Sigma Life Science, SUA), iar produsele de hidroliză, disociate cu dodecilsulfat de sodiu, au fost examinate prin electroforeza în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE).

Modelarea omologă a structurilor terțiare și cuaternare ale ginnacinei a fost realizată cu ajutorul programului Swiss-Model, folosind structura cristalină a globulinei 11S pdb|3qac din amarant *Amaranthus hypochondriacus* ca matriță. Suprafața accesibilă la solvent (ASA) a resturilor în structura ginnacinei și a altor globuline 11S, exprimată în Å², a fost calculată folosind programul <http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>. Valoarea relativă a ASA a restului X din structura proteinei a fost exprimată ca % din accesibilitatea lui în tripeptida GXG. Programul DeepView/Swiss-PdbViewer v.3.7 a fost utilizat pentru a construi diagramele panglică, precum și pentru a identifica legăturile de hidrogen intersubunitare în oligomerii globulinelor 11S.

3.2. Proteoliza ginnacinei

SDS-electroforeza ginnacinei inițiale (Figura 3.1, pista 1) relevă două benzi ale α-catenelor (28,3 kDa și 26,7 kDa) și o bandă a β-catenei (21,1 kDa). Astfel, în componența

subunităților ginnacinei sunt incluse cel puțin două tipuri de $\alpha\beta$ -subunități. Ca și în cazul altor globuline 11S, α - și β -catenele (domeniile N- și C-terminale) ginnacinei sunt unite printr-o legătură disulfurică (piesele 1 și 8). Este cunoscută secvența de aminoacizi numai a uneia dintre subunitățile ginnacinei (caa90641 cu masele moleculare ale α - și β -catenelor 27,5 kDa și respectiv 21,1 kDa).

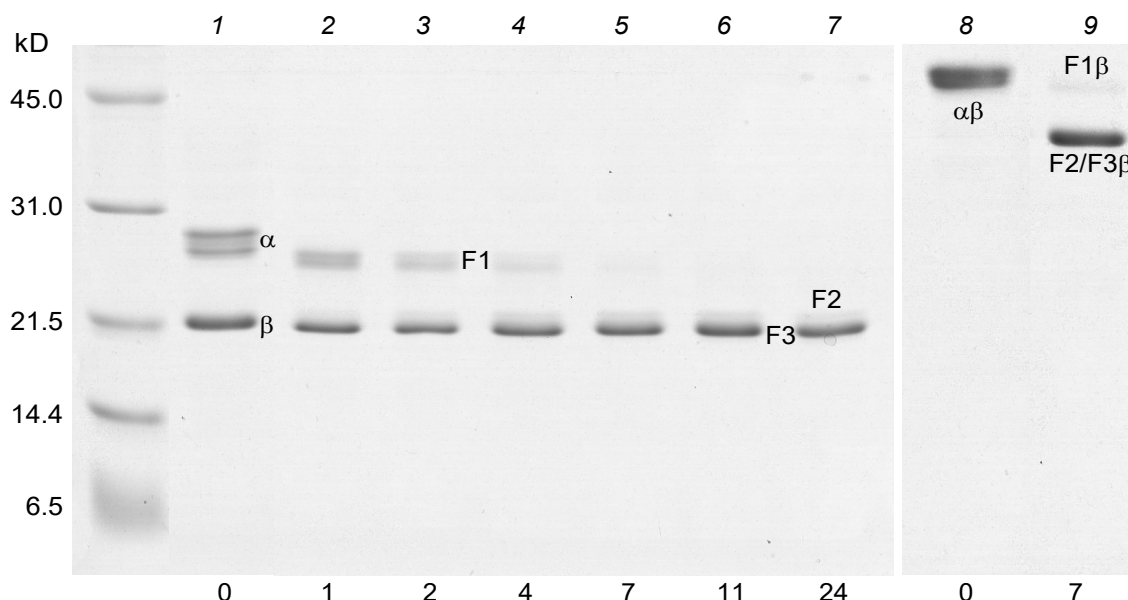


Fig. 3.1. SDS-electroforeza ginnacinei intacte și produselor ei de proteoliză în prezență (piste 1-7) și în absența (pistele 8, 9) 2-mercaptoetanului. Pe partea stângă sunt arătate masele moleculare ale markerilor. Cifrele de jos corespund timpului de reacție (h).

Proteoliza ginnacinei începe cu formarea a cel puțin două fragmente intermediare F1 ale α -catenelor cu masele moleculare de 25,8 și 25,2 kDa (Figura 3.1, piesele 2-5). La proteoliza ulterioară fragmentele F1 dispar și apar două fragmente: fragmentul principal F3 (21,1 kDa) care după mobilitate coincide cu β -catenele și fragmentul minor F2 (22,0 kDa). Produsele cu masa moleculară relativ mică (mai puțin de 20 kDa) sunt absente. Astfel, β -catenele ginnacinei sunt insensibile la proteoliza limitată, așa cum este tipic pentru majoritatea globulinelor 11S din semințele studiate [1], iar hidroliza α -catenelor constă în scurtarea lor N- sau C-terminală succesivă.

3.3. Cinetica proteolizei ginnacinei

Pentru a descrie mecanismul proteolizei ginnacinei cu papaină, am studiat cinetica acestui proces bazată pe determinarea a două valori relative – concentrația de masă a proteinei P% și masa moleculară a moleculei reziduale nedisociate M%. Compararea acestor valori ne permite să

determinăm care dintre cele două mecanisme ale proteolizei se observă pe măsură ce se dezvoltă acest proces – proteoliza limitată sau proteoliza „una câte una” explozivă.

În prima etapă a proteolizei (până la 2 ore), scăderea relativă a concentrației de masă a proteinei P în hidrolizat nu depășește scăderea masei sale moleculare M (Figura 3.2, graficele 1 și 2), ceea ce indică absența semnelor detectabile ale proteolizei „una câte una”. Aceste semne apar în etapa intermediară (2-7 ore), iar în continuare proteoliza „una câte una” se desfășoară ca o reacție de ordinul pseudo-unu (Figura 3.2, graficul 3). Extrapolarea porțiunii liniare a graficului 3 până la zero duce la o valoare mai mare de 100%. Astfel, ginnacina nativă, la fel ca și globulinele 11S din soia și dovlea [2, 3], este insensibilă la proteoliza „una câte una”, care începe abia după atingerea unui anumit nivel de proteoliză limitată.

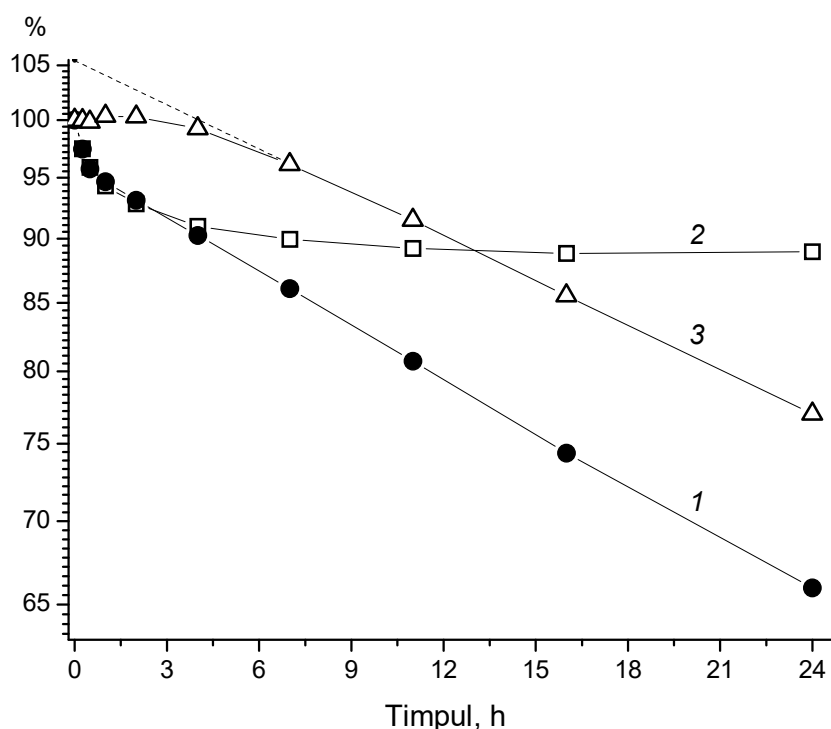


Fig. 3.2. Cinetica proteolizei ginnacinei

1 – concentrația de masă P a proteinei reziduale; 2 – masa sa moleculară medie M. P și M sunt exprimate în % din valorile lor inițiale. Graficul 3 ($P\% + [100\% - M\%]$) descrie cinetica exclusiv a proteolizei „una câte una”. Scala ordonatei este logaritmică.

3.4. Modelul structural al ginnacinei

Modificările structurale ale ginnacinei în timpul proteolizei limitate pot fi evaluate pe baza modelului său de structură terțiară și cuaternară, precum și pe baza informațiilor disponibile privind legăturile proteolizei altor globuline 11S din semințe. Modelul structural al subunităților ginnacinei (Figura 3.3) conține toate structurile secundare caracteristice tuturor structurilor

cristaline cunoscute ale globulinelor 11S. În structura cuaternară model a ginnacinei, la fel ca și în structurile cristaline ale altor globuline 11S, subunitățile sunt combinate în trimeri

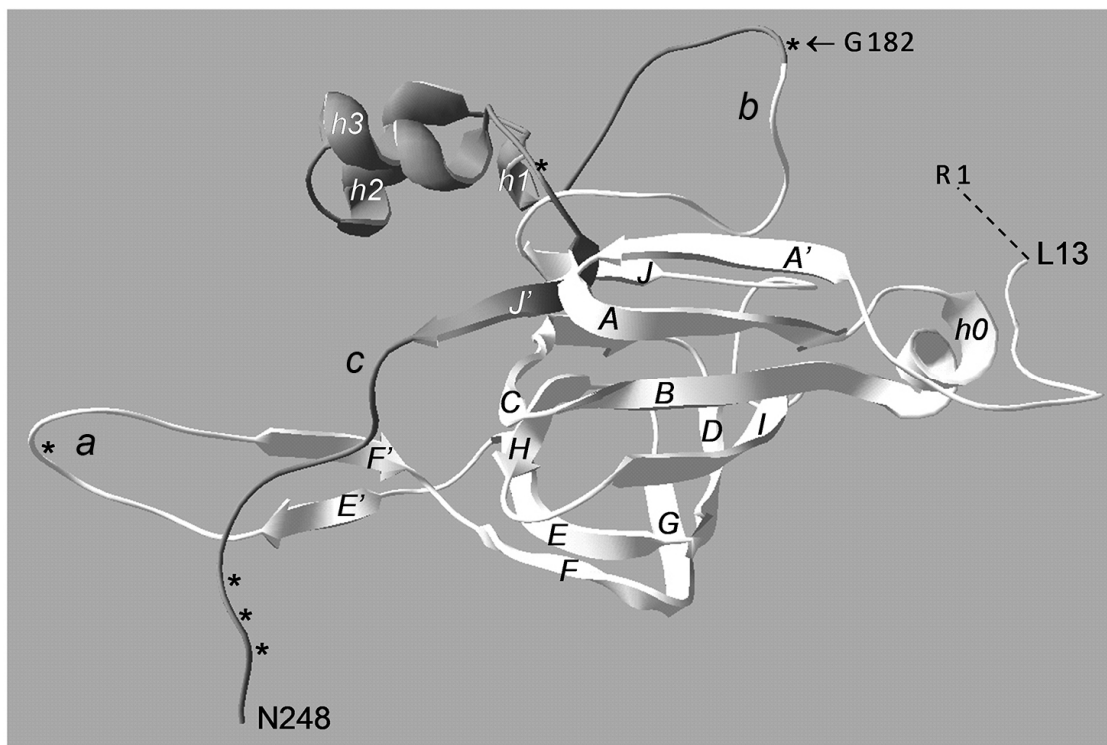


Fig. 3.3. Diagrama panglică a structurii model a α -catenei ginnacinei

La baza structurii model ale α - și β -catenelor ginnacinei, precum și la alte globuline 11S, se află β -barrel-ul format din β -strend-urile antiparalele *BCDEFGHI*, conectat la un grup de α -helixuri *h1*, *h2*, *h3* și suplimentat cu β -strend-urile *A-A'*, *E'-F'* și *J-J'* și α -helixul *h0*. Linia punctată arată regiunea N-terminală în afara modelului. Asterixurile indică poziția resturilor de aminoacizi în structura ginnacinei cu accesibilitate sporită (> 90%) la solvent, care corespund specificității de substrat a papainei. Partea întunecată a diagramei corespunde regiunii C-terminale care este eliminată la sfârșitul proteolizei limitate.

Legitățile proteolizei limitate a ginnacinei determinate de structura sa. Trei regiuni extinse în α -catenele globulinelor 11S sunt potențial sensibile la atacul proteolitic: *a* – între β -strend-urile *E'* și *F'*; *b* – între β -barrel și grupul de α -helixuri; *c* – regiunea C-terminală (Figura 3.3).

Bucula între β -strendurile *E'* și *F'* în structura ginnacinei este insensibilă la acțiunea papainei, deoarece în produsele de hidroliză fragmentele cu masa moleculară mai mică de 20 kDa, care corespund jumătății N-terminale a β -barrel-ului (β -strendurile *A'-E'*, Figura 3.3), sunt absente (Figura 3.1). În mod similar, această buclă este insensibilă la atacul papainei în globulinele 11S din soia [2] și dovleac [3].

Proteoliza globulinelor 11S [1, 7, 19, 20] începe cu scindarea regiunii C-terminale a α -catenelor. Ginnacina nu face excepție de la această regulă, așa cum se dovedește prin apariția fragmentelor intermediare F1 în stadiile inițiale ale proteolizei (Figura 3.1).

Anterior s-a arătat că proteoliza ulterioară a α -catenelor globulinelor 11S din soia și din dovleac cu papaină duce la scindarea buclei extinse între β -strendul J și α -helixurile $h1-h3$ [2, 3]. În structura model a ginnacinei, această buclă (b) conține restul Gly182 cu accesibilitate crescută de solvent (Figura 3.3) și, prin urmare, cu sensibilitate crescută la atacul proteolitic. Scindarea legăturii peptidice formată de restul Gly182 în poziția P1 este foarte probabilă, deoarece această legătură corespunde specificității de substrat a papainei și din moment ce masa moleculară calculată a fragmentului Arg1-Gly182 (20,2 kDa, Figura 3.3) este apropiată de valoarea obținută experimental pentru fragmentul F3 (masa moleculară aparentă a fragmentului final F3 21,1 kDa, (Figura 3.1).

În timpul hidrolizei ginnacinei cu papaină, precum și a globulinelor 11S din soia și din dovleac [2, 3], regiunea scindabilă dintre α -helixurile $h1-h3$ și β -strendul J' este distrusă, cu formarea de produse cu masa moleculară mică, care nu sunt detectate prin electroforeză (Figura 3.1). Acest lucru duce la modificări structurale semnificative, datorită cărora ginnacina devine sensibilă la proteoliza „una câte una”. Astfel, proteoliza limitată a ginnacinei, precum și a globulinelor 11S din soia și din dovleac [2, 3] joacă un rol reglator, inițiind degradarea masivă a acestor proteine.

Rolul reglator al proteolizei limitate s-a format în stadiile timpurii ale evoluției globulinelor 11S din semințe. Secvențele de aminoacizi ale globulinelor 11S din semințe în afara regiunilor variabile a , b și c (Figura 3.3) sunt foarte conservative, inclusiv în regiunea structurală a α -helixurilor $h1-h3$ și β -strendului J' . Este posibil ca această regiune să fie capabilă de degradare în timpul proteolizei nu doar a globulinei 11S din ginkgo, soia și dovleac, dar și a altor proteine din această familie.

Pentru a verifica această ipoteză, s-au comparat secvențele de aminoacizi ale α -catenelor ginnacinei și tuturor globulinelor 11S cu structura terțiară cunoscută. După cum urmează din Tabelul 3.1, accesibilitatea la solvent a regiunii α -helixurilor $h1-h3$ și β -strendului J' este de 2,3-3,4 ori mai mare, decât cea a jumătății N-terminale a β -barrelui (β -strendurile $B-E$), insensibilă la proteoliza limitată [1]. Aceasta indică capacitatea potențială de scindare profundă a acestei regiuni în timpul proteolizei globulinelor 11S.

Identificarea legăturilor de hidrogen între subunitățile A și B din structura cuaternară a globulinelor 11S (Tabelul 3.1), realizată în acest studiu, a relevat că până la jumătate din aceste legături sunt formate cu participarea aminoacizilor din regiunea C-terminală a subunității A din afara regiunii β -barrelui- β -strendul J .

Aparent, aceste legături sunt capabile să fie distruse în timpul proteolizei nu numai a ginnacinei (Figura 3.4) și a globulinelor 11S din soia și din dovleac [2, 3], dar și a altor globuline 11S cu structura cuaternară cunoscută datorită distrugerii regiunii α -helixului $h1$ - β -strendului J' .

Tabelul 3.1. Accesibilitatea la solvent și legăturile de hidrogen intersubunitare în oligomerii globulinelor 11S

Specia	pdb	Regiunea structurii			
		ASA, Å ²		H-legături	
		<i>B – E</i>	<i>h1 – J'</i>	<i>A' – J</i>	<i>h1 – J'</i>
<i>Ginkgo biloba</i>		15,3	42,4	10	11
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	3qac	11,6	39,7	14	8
<i>Prunus dulcis</i>	3fz3	13,7	33,2	16	10
<i>Brassica napus</i>	3kgl	13,5	36,8	15	12
<i>Cucurbita maxima</i>	2e9q	12,9	33,9	11	11
<i>Glycine max</i>	2d5h	13,4	34,7	9	12
<i>Glycine max</i>	1fxz	15,2	34,8	11	9
<i>Pisum sativum</i>	3ksc	13,0	37,6	14	9
<i>Arachis hypogaea</i>	3c3v	15,9	37,0	16	10
Valorile medii		1,8	36,7	13	10

ASA – suprafața accesibilă la solvent, în medie, a unui rest de aminoacid în jumătatea N-terminală a β -barrelui (β -strendurile *B-E*) și în regiunea α -helixurilor *h1*, *h2*, *h3* și β -strendului *J'* (*h1-J'*). H-legături – numărul legăturilor de hidrogen, formate cu participarea resturilor de aminoacizi din regiunea β -strendurilor *A'-J* și din regiunea C-terminală (α -helixul *h1*- β -strendul *J'*).

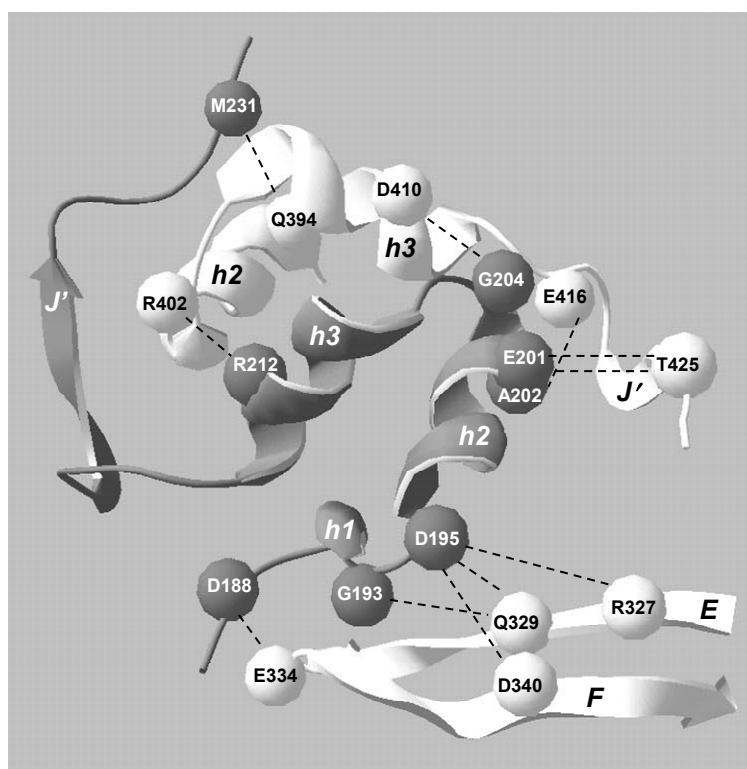


Fig. 3.4. Legăturile de hidrogen (linii punctate) responsabile de interacțiunea dintre subunitățile A și B în structura cuaternară model a ginnacinei

Diagrama panglică este limitată la regiunea C-terminală a α -catenei subunității A, care este eliminată în timpul proteolizei limitate (partea întunecată a diagramei) și la regiuni corespunzătoare ale subunității B. Resturile de aminoacizi implicate în formarea legăturilor de hidrogen (distanța de 2,3-3,4 Å) sunt arătate prin sfere.

Ca urmare a unei slăbiri semnificative a interacțiunilor intersubunitare, globulinele 11S pot dobândi capacitatea de a disocia reversibil, expunând legăturile peptidice potențial sensibile la proteoliză, dar mascate în molecula nativă.

Rezultatele studiilor arată că capacitatea globulinelor 11S din semințe de degradare masivă prin mecanismul „una câte una”, dobândită doar după finalizarea proteoliziei limitate relativ profunde, a apărut deja în stadiile incipiente ale evoluției acestor proteine, ale căror structuri primare și superioare sunt foarte conservative [1, 21]. Prin urmare, se poate presupune că rolul proteolizei limitate în inițierea degradării profunde a globulinelor 11S s-a păstrat în timpul evoluției la multe proteine de rezervă din această familie.

4. PROTEOLIZA CA MODALITATE DE REDUCERE A ALERGENICITĂȚII GLOBULINELOR DE REZERVĂ DIN ARAHIDE

În prezent, până la 30% din populația lumii suferă de boli alergice, dintre care o parte semnificativă este alergiile alimentare. Alergene sunt multe proteine de rezervă din semințe, în principal globulinele de rezervă din arahide și din soia, care sunt utilizate pe scară largă în industria alimentară. După cum rezultă din analiza datelor din literatură (capitolul 1), proteoliza limitată poate fi o modalitate de a reduce nivelul de alergenicitate a globulinelor de rezervă din semințe.

4.1. Materialul și metodele de cercetare

Pentru a purifica globulinele 7S și 11S din semințele de arahide (*Arachis hypogaea* L.), s-a utilizat salifierea cu sulfatul de amoniu și cromatografia pe fenil-sefaroză CL-4B (Pharmacia Biotech, Suedia). Preparatele obținute au fost hidrolizate cu papaină (Sigma Life Science, SUA) și tripsină (Spofa, CSSR), iar produsele de hidroliză, disociate cu dodecilsulfat de sodiu, au fost studiate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE). Punctele de clivaj ale globulinelor 7S și 11S în timpul proteolizei lor au fost identificate pe baza datelor SDS-PAGE (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), luând în considerare specificitatea de substrat a proteinazelor, precum și în comparație cu datele din literatură [1] privind legăturile proteolizei limitate a secvențelor omoloage de aminoacizi ale globulinelor de rezervă din semințele de soia și alte plante.

4.2. Legăturile proteolizei limitate cu tripsină a globulinei 11S din arahide

Alergenul Ara h3 din arahide aparține familiei globulinelor 11S din semințe, relativ conservativă [22]. Structura hexamerică a globulinelor 11S este formată printr-o combinație

aleatorie a mai multor variante de subunități (nu mai puțin de opt, în cazul globulinei 11S din arahide). Fiecare dintre subunități este sintetizată într-un singur lanț polipeptidic, scindat posttranslational în α - și β -catene, care formează respectiv domeniile N- și C-terminal structural echivalente. Fiecare domeniu constă din β -barrel format din opt β -strenduri antiparalele de bază (*BCDEFGHI*) legate cu o grupă de α -helixuri *h1*, *h2* și *h3*, și suplimentat cu β -strendurile *Z*, *A'*-*A*, *E'-F'* și *J'-J* și α -helixurile *h0* și *h1'* (Figura 4.1). Domeniile C-terminale sunt conservative, în timp ce domeniile N-terminale conțin trei inserții hidrofille nestructurate: *a* – între strendurile *E* și *F*, *b* – între β -barrel și grupul de α -helixuri și *c* – linkerul interdomenic alungit (Figura 4.1).

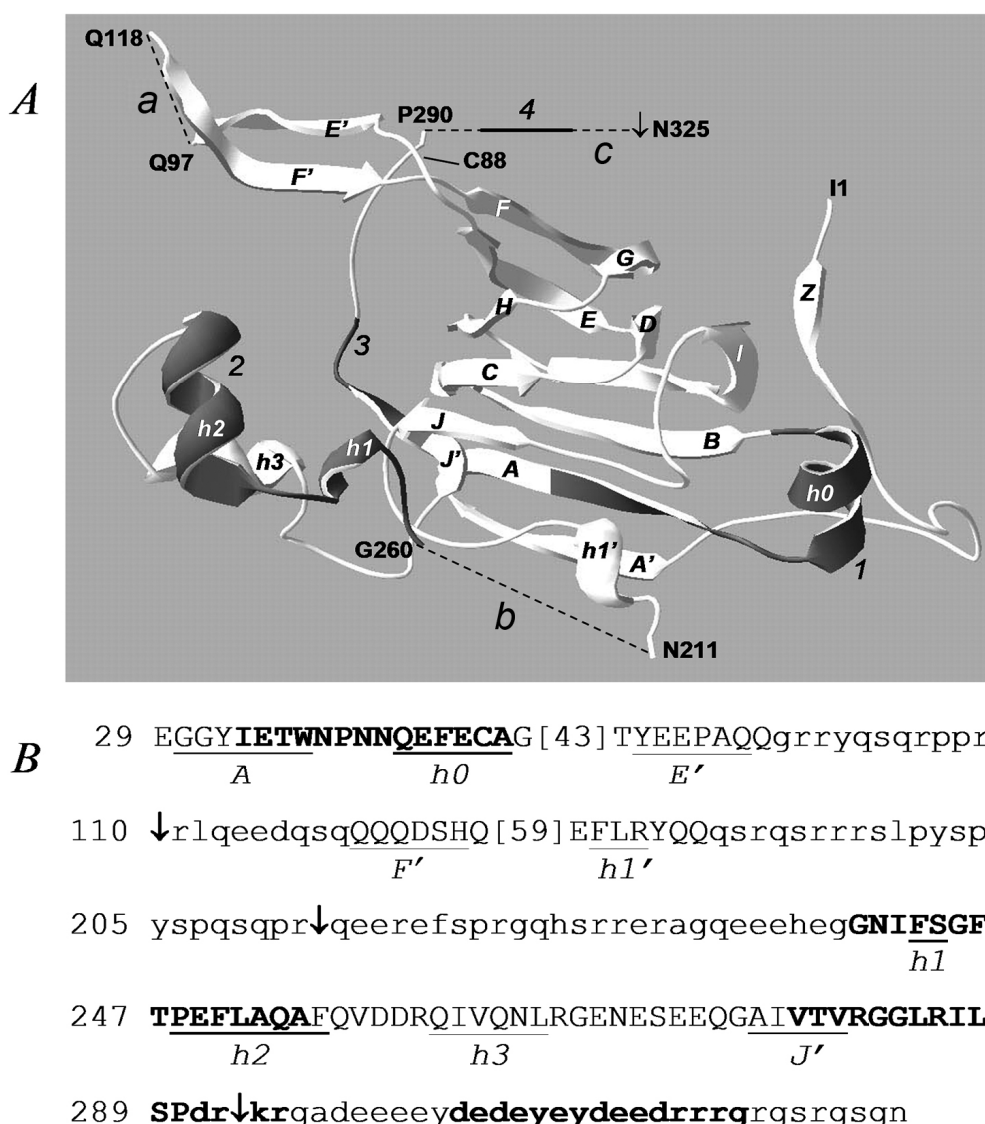


Fig. 4.1. Structura domeniului N-terminal al subunităților globulinei 11S din arahide, Ara h3 (pdb|3c3v)

A – Diagrama panglică a structurii terțiare. Regiunile nestructurate *a*, *b* și *c* sunt prezentate prin linii punctate. Porțiunile întunecate ale diagramei corespund secvențelor epitopilor IgE 1-4, identificați în molecula Ara h3. B – Structura primară. Literele minuscule indică regiunile nestructurate *a*, *b* și *c*. Săgețile corespund legăturilor peptidice clivabile. Numărul resturilor de aminoacizi lipsă este indicat în paranteze pătrate. Secvențele epitopilor IgE 1-4 sunt indicate cu bold.

SDS-PAGE în prezența ME a preparatului purificat al globulinei 11S din arahide (Figura 4.2, *pista 1*), relevă trei benzi majore și o bandă minoră cu masele moleculare aparente apropiate de cele calculate pentru cele patru variante principale ale α -catenelor acestei proteine. β -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 [31].

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 (Figura 4.2), constituit din β -catenele intacte și trei fragmente ale α -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 (respectiv +ME și -Me, Figura 4.2.) indică existența a două tipuri de fragmente ale α -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 β -catena, și în absența ME formează zona K2 β (Figura 4.2).

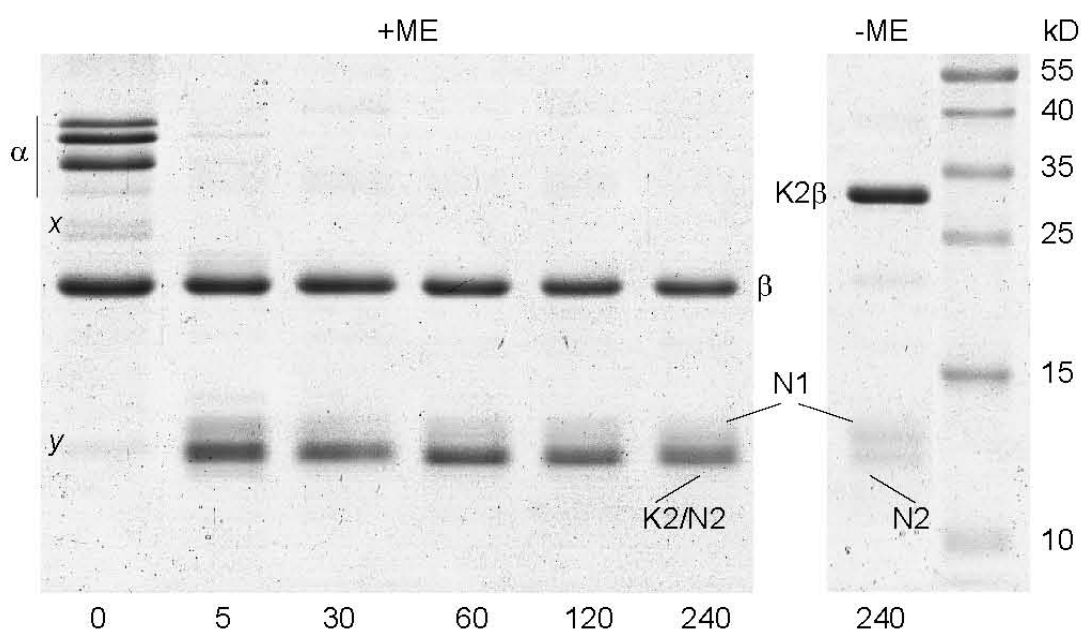


Fig. 4.2. SDS-PAGE în prezența (+ME) și absența (-Me) 2-mercaptoetanului a globulinei 11S din arahide în timpul proteolizei cu tripsină

Rândul de jos arată timpul de reacție (min). Pe dreapta sunt indicate masele moleculare ale proteinelor markeri.

4.3. Posibilități de reducere a alergenicității globulinei 11S din arahide prin proteoliză

În Ara h3, legumina din arahide, au fost identificați patru epitopi IgE [15] (Figura 4.1): primul epitop în regiunea N-terminală a β -barrelui (β -strendul *A* și α -helix *h0*), al doilea și al treilea epitop, respectiv în regiunea α -helixului *h1/h2* și în regiunea adiacentă β -strendului *J'*, și al patrulea epitop în regiunea hidrofilă C-terminală.

Trei din cei patru epitopi IgE, identificați în subunitatea globulinei 11S din arahide, Ara h3 (Figura 4.1) aparțin regiunii C-terminale a α -catenei, care este scindată prin proteoliză limitată. Astfel, proteoliza limitată a subunității Ara h3 duce la o scădere semnificativă a nivelului său de alergenicitate.

Molecula heterohexamerică a globulinei 11S din arahide conține patru variante principale de subunități, care sunt similare după structura primară a regiunii C-terminale conservative (α -helixuri- β -strendul *J'*) al α -catenelor. Prin urmare, este foarte probabil ca epitopii IgE identificați în subunitatea Ara h3 să fie prezenți în alte subunități ale acestei proteine. Astfel, se poate aștepta ca proteoliza limitată să ducă la o scădere parțială a alergenicității întregii molecule hetero-hexamerice a globulinei 11S din arahide datorită eliminării a cel puțin jumătate din epitopii IgE.

4.4. Legitățile proteolizei limitate cu papaină a globulinei 7S din arahide

Domeniile N- și C-terminale ale subunităților globulinei 7S din arahide sunt structural echivalente cu α - și β -catenele globulinelor 11S, dar diferă de cele din urmă după mai multe caractere [23]. Regiunea linkerului interdominic în globulinele 7S nu este scindată; structurile lor nu au o legătură disulfurică interdomenică (Figura 4.3.).

În timpul hidrolizei cu papaină cel mai mare dintre fragmentele Ara h1 (fragmentul *I* cu masa moleculară aparentă de 48,7 kDa, Figura 4.4), care predomină cantitativ în etapele inițiale ale reacției, cu o probabilitate ridicată corespunde secvenței Asn88-Arg502.

Orice alte căi alternative de formare a fragmentului *I* cu masa moleculară de aproximativ 49 kDa sunt practic imposibile, deoarece sunt asociate cu scindarea legăturilor peptidice din regiunile structural organizate inaccesibile ale moleculei. De menționat că masa moleculară aparentă a fragmentului *I* este puțin exagerată din cauza că restul de Asn437 din regiunea C-terminală a Ara h1 este glicozilat. Fragmentul 2 este format în paralel cu fragmentul *I* în rezultatul clivării în regiunea *d* și îndepărtării inițiale incomplete a regiunii N-terminale a prelungirii *a*. Fragmentul 3 este format din fragmentul *I* (clivarea aceleiași regiuni *d*) și din fragmentul 2 după înlăturarea restului prelungirii N-terminale *a*. Fragmentele 6 și 8 sunt formate

din fragmentul 3 în rezultatul scindării în regiunea *b*. Fragmentul 7 este format din fragmentul 6 în legătură cu scurtarea N-terminală și C-terminală. În final, fragmentul 10 este format din fragmentul 9 datorită scurtării N-terminale (Figura 4.4).

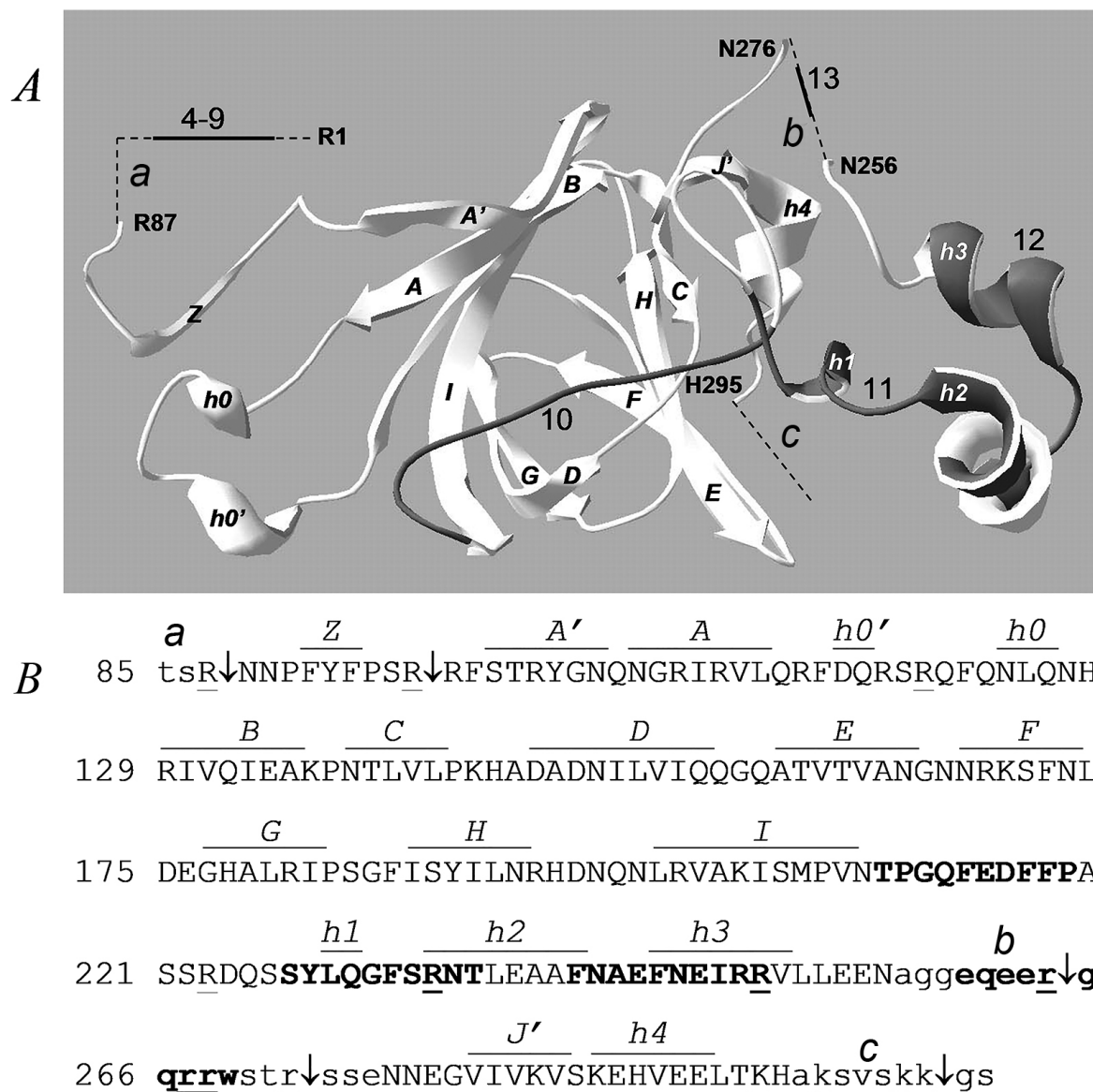


Fig. 4.3. Structura domeniului N-terminal al globulinei 7S din arahide, Ara h1 (pdb|3smh)

A – Diagrama panglică a structurii terțiare. Regiunile nestructurate *a*, *b* și *c* sunt prezentate prin linii punctate. Secțiunile întunecate ale diagramei corespund secvențelor de aminoacizi ale epitopilor IgE 4-13, identificați în molecula matură a Ara h1. B – Structura primară. Literele minuscule indică regiunile nestructurate *a*, *b* și *c*. Săgețile corespund legăturilor peptidice clivabile. Resturile de aminoacizi cu accesibilitate crescută la solvent ($ASA > 100 \text{ \AA}$), care corespund specificității de substrat a papainei sunt subliniate. Cu bold sunt prezentate secvențele epitopilor IgE 10-13.

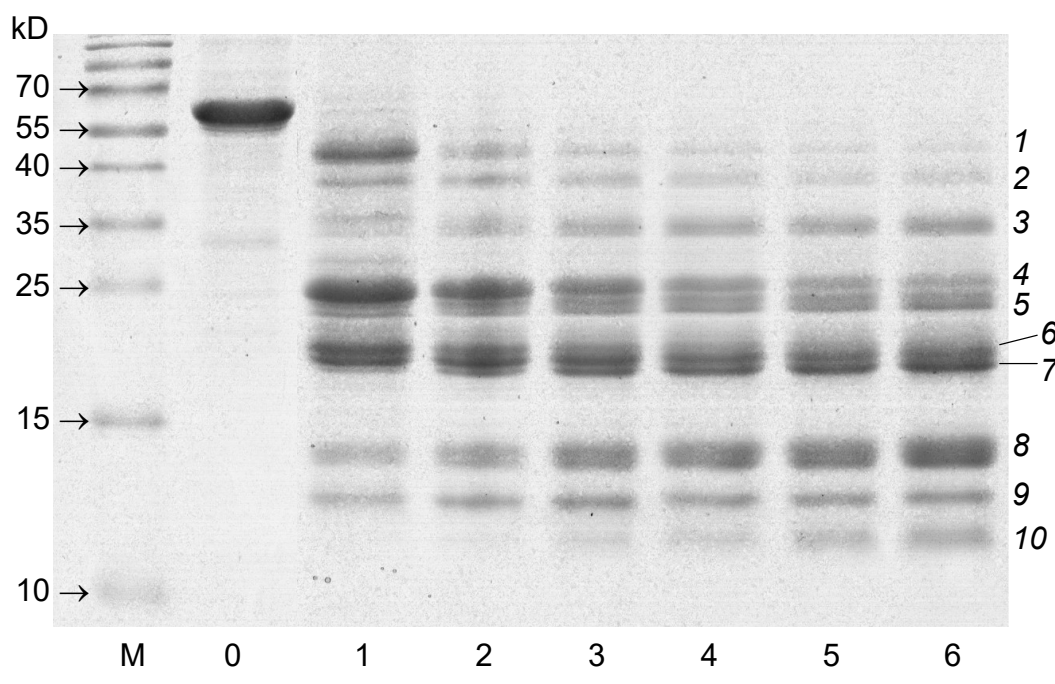


Fig. 4.4. SDS-PAGE a alergenului 7S, Ara h1, în timpul hidrolizei cu papaină
 Linia de jos arată timpul de reacție (h). Pe partea stângă sunt indicate masele moleculare ale markerilor. Pe dreapta este arătată numerotarea fragmentelor.

Proteoliza Ara h1 cu papaină începe cu îndepărtarea regiunii N-terminale nestructurate *a*. Trebuie menționat, că sensibilitatea la proteoliza limitată a regiunii N-terminale este caracteristică tuturor globulinelor 7S de tip convicilinic. Proteoliza ulterioară duce la clivarea regiunii nestructurate *c* între domeniile N- și C-terminale și se termină cu scindarea regiunii *b*.

Toate legăturile peptidice, fără excepție, a căror scindare cu papaina a fost stabilită în această lucrare aparțin regiunilor nestructurate extinse din structura cristalină a subunității pdb|3smh (Figura 4.3): extensiei hidrofile N-terminale *a* (R53-R54, R87-N88, R96- R97), caracteristică globulinelor 7S de tipul convicilinelor; buclei *b* între α - helixul *h3* și β -strendul *J'* (R264-G265, R272-S273) specifică pentru globulina 7S din arahide; linkerului interdomenic *c* (K302-G303), precum și buclei *d* între β -strendurile *E* și *F* din domeniul C-terminal (R395-R396, R411-E412) și extensiei sale C-terminale *e* (R502-P503).

4.5. Posibilități de reducere a alergenicității globulinei 7S din arahide prin proteoliză

În subunitatea globulinei 7S din arahide Ara h1, care se caracterizează prin cea mai mare alergenicitate dintre globulinele de rezervă din semințe, s-a relevat prezența a 21 de epitopi IgE [14]. Epitopii IgE 1-3 aparțin secvenței N-terminale a subunității Ara h1, eliminate în timpul processingului proteolitic [24]. A treia parte a celor 18 epitopi rămași în molecula matură a Ara h1 (epitopii IgE 4-9, Figura 4.3A) 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 papaina a regiunii nestructurate *b*, care conține epitopul IgE 13.

Subunitățile globulinei 7S din arahide în compoziția moleculei sale hetero-trimerice sunt extrem de conservative. Este foarte probabil ca epitopii IgE, identificați în Ara h1, să fie de asemenea prezenți și în alte subunități ale acestei proteine. Astfel, se poate aștepta ca proteoliza limitată cu papaină să ducă la o scădere parțială a alergenității întregii molecule hetero-oligomerice a globulinei 7S din arahide, datorită îndepărtării a mai mult de o treime din epitopii IgE.

4.6. Imunoreactivitatea încrucișată a globulinelor de rezervă din semințe

Programul SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>) oferă posibilitatea de a evalua cantitativ probabilitatea prezenței unui epitop IgE într-o proteină dată. Pentru a evalua imunoreactivitatea încrucișată potențială a globulinelor de rezervă, se recomandă de a utiliza ca șabloane doar acei epitopi IgE identificați în globuline 7S și 11S care prezintă imunoreactivitate încrucișată reală, adică coincid parțial după poziție în structurile lor primare și terțiare. Această condiție este satisfăcută de epitopii IgE ai globulinelor 11S din arahide, Ara h3 (epitopul 2) și din soia, Gly m G1 (epitopul 1), precum și de epitopul 11 globulinei 7S din arahide, Ara h1 (Figura 4.5).

			<u>h1</u>	<u>h2</u>	
Ara h3	238	EGGN I <u>F</u> S <u>G</u> F <u>T</u> P <u>E</u> F <u>L</u> A <u>Q</u> AFQVD			
Gly G1	197	EGGS I <u>L</u> S <u>G</u> F <u>T</u> L <u>E</u> F <u>L</u> E <u>H</u> A <u>F</u> S <u>V</u> D			
Ara h1	138	DQSS S <u>Y</u> L <u>Q</u> GF<u>S</u>R<u>N</u>T<u>L</u>E<u>A</u>A<u>F</u>N<u>A</u>E			
		: . . : . ** : : * ** . . :			

Fig. 4.5. Imunoreactivitatea încrucișată a epitopilor IgE ai globulinelor 11S din arahide, Ara h3 și din soia Gly m G1 și ai globulinei 7S din arahide, Ara h1

Secvențele epitopului IgE sunt evidențiate cu bold. Resturile de aminoacizi, înlocuirea cărora duce la scăderea nivelului de alergenitate a Ara h3 și Ara h1 ([14, 15]) sunt subliniate. În structurile cristaline ale celor trei proteine, poziția și lungimea α -helixurile *h1* și *h2* coincid complet.

S-a efectuat analiza a două duzini de secvențe de aminoacizi ale globulinelor 11S și 7S omoloage cu cele prezentate în Figura 4.3. Rezultatele obținute ale evaluării cantitative a imunoreactivității încrucișate potențiale a globulinelor de rezervă sunt rezumate mai jos.

1. S-a stabilit imunoreactivitatea încrucișată a nouă globuline 11S. Toate secvențele globulinelor 11S și 7S studiate, fără excepție, conțin o pereche de resturi Gly și Phe

superconservative (Figura 4.5). Înlocuirea ambelor resturi în Ara h1 (globulina 7S) și a restului Phe în Ara h3 (globulina 11S) duce la scăderea nivelului de alergenicitate a acestor globuline (Figura 4.5). Aceasta este o dovadă suplimentară în favoarea imunoreactivității încrucișate nu numai a globulinelor 11S, dar și a globulinelor 7S.

2. S-a arătat imunoreactivitatea încrucișată a cinci globuline 7S de tip *a*. S-a constatat lipsa imunoreactivității încrucișate a globulinelor 7S de acest tip și a globulinelor 11S.

3. S-a stabilit imunoreactivitatea încrucișată a șapte globuline 7S de tip *b* și nouă globuline 11S. Restul Leu, înlocuirea căruia în epitopul IgE a Ara h3 duce la scăderea nivelului de alergenicitate a acestei proteine (Figura 4.5), este prezent în toate cele șapte globuline 7S de tip *b*. Aceasta este o dovadă suplimentară în favoarea imunoreactivității încrucișate a globulinelor 11S și a globulinelor 7S de tip *b*.

Rezultatele expuse ale studiului privind imunoreactivitatea încrucișată potențială a globulinei 11S, Gly m G1 și globulinelor 7S de tip *b* pot stimula experimentele ulterioare de identificare a epitopilor IgE în globulinele 7S din această grupă.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii

1. A fost stabilită originea globulinelor de rezervă din semințe, leguminelor și vicilinelor, din oxalat-decarboxilazele bidomenice bacteriene (capitolul 2). Concluzia se bazează pe rezultatele analizei evolutive a secvențelor de aminoacizi din colecția vastă de globuline de rezervă din semințe și proteinelor înrudite structural din bacterii, eucariotele inferioare, din plantele cu spori și plantele cu semințe [17].

2. Precursorii evolutivi străvechi **directi** ai globulinelor de rezervă din semințe sunt proteinele legumino-similare din alga verde harofită *Klebsormidium nitens* (capitolul 2). Concluzia se bazează pe analiza tuturor etapelor succesive ale evoluției globulinelor de rezervă din semințe, pornind de la oxalat-decarboxilazele bacteriene și proteinele înrudite din alga verde clorofită *Coccomyxa subellipsoidea*, precum și pe rezultatele modelării computerizate a structurilor terțiare și cuaternare ale proteinei din alga verde *Klebsormidium nitens* [25].

3. Structurile primare și terțiare ale leguminei reflectă trăsăturile străvechi ale globulinelor de rezervă din semințe (capitolul 2). Concluzia se bazează pe topologia arborelui evolutiv al globulinelor de rezervă din semințe, precum și pe rezultatele analizei cantitative ale comparării secvențelor de aminoacizi și structurilor cristaline ale leguminelor și vicilinelor și precursorului lor din cianobacterii [17].

4. Proteoliza limitată a leguminei din semințele *Ginkgo biloba* (ginnacina) inițiază degradarea masivă prin mecanismul „una câte una”. Rolul de reglare corespunzător al proteolizei limitate este caracteristic multor globuline de rezervă din familia leguminelor (capitolul 3). Prin urmare, mecanismul de reglare a degradării globulinelor de rezervă în timpul germinării semințelor, format deja la nivelul Ginkgophyta, a fost moștenit în timpul evoluției de globulinele de rezervă din semințe. Concluziile se bazează pe rezultatele studierii cineticii proteolizei limitate și „una câte una” a ginnacinei și a analizei tuturor structurilor cristaline cunoscute ale leguminelor, precum și pe rezultatele analizei legăturilor de hidrogen intersubunitare responsabile de formarea structurii cuaternare a leguminelor [26, 27].

5. Proteoliza limitată a leguminei și a vicilinei din arahide duce la o scădere semnificativă a nivelului de alergenicitate a acestor proteine de rezervă (capitolul 4). S-a stabilit că proteoliza limitată cu papaină scindează complet regiunea N-terminală nestructurată în structura primară a vicilinei din arahide, unde sunt prezenți o treime din epitopii IgE identificați în această proteină. S-a arătat scindarea în timpul proteolizei limitate cu papaină și tripsină, a regiunii C-terminale a domeniului N-terminal al leguminei din arahide, unde sunt prezenți trei din cei patru epitopi IgE, identificați în această proteină [28-34].

Recomandări

1. Proteoliza limitată poate fi recomandată ca o modalitate de a dezvolta metode eficiente de reducere semnificativă a nivelului de alergenicitate al globulinelor de rezervă din arahide și din soia, semințele cărora sunt utilizate pe scară largă în produsele alimentare [30].

BIBLIOGRAFIE

1. SHUTOV, A.D., 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. ISBN 978-1-63117-781-1
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, vol.169, p.1227-1233. ISSN 0176-1617. [doi:10.1016/j.jplph.2012.06.004](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.004)
3. 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 [doi:10.1134/S0006297914080100](https://doi.org/10.1134/S0006297914080100).
4. DUNWELL, J.M. Structure, function, and evolution of vicilin and legumin seed storage proteins. In: *Biotechnology of Biopolymers – From Synthesis to Patents* (Steinbüchel, A., Doi, Y., eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005, p. 967-997. ISBN 978-3527311101

5. BÄUMLEIN, H., BRAUN, H., KAKHOVSKAYA, I.A., SHUTOV, A.D. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. In: *J. Mol. Evol.*, 1995, vol.41, p.1070-1075. ISSN 0022-2844. [doi:10.1007/bf00173188](https://doi.org/10.1007/bf00173188)
6. SHUTOV, A.D., BÄUMLEIN, H. Origin and evolution of seed storage globulins. In: *Seed Proteins* (P. R. Shewry & R. Casey, eds.), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999, p. 543-561. ISBN 978-94-011-4431-5.
7. SHUTOV, A.D., BLATTNER, F.R., BÄUMLEIN, H., MÜNTZ, K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints of seed storage globulin evolution. In: *J. Exp. Bot.*, 2003, vol.54, p. 1645-1654. ISSN 0022-0957. [doi:10.1093/jxb/erg165](https://doi.org/10.1093/jxb/erg165)
8. DUNWELL, J. M. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. In: *Biotechnology Genet. Engineering Rev.*, 1998, vol.15, p. 1-32. ISSN 0264-8725. doi.org/10.1080/02648725.1998.10647950
9. DUNWELL, J. M., GANE, P. J. Microbial relatives of seed storage proteins; conservation of motifs in a functionally diverse superfamily of enzymes. In: *J. Mol. Evol.*, 1998, vol.46, p. 147-154. ISSN 0022-2844. [doi:10.1007/pl00006289](https://doi.org/10.1007/pl00006289)
10. KHURI, S., BAKKER, F.T., DUNWELL, J. M. Phylogeny, function and evolution of cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. In: *Mol. Biol. Evol.*, 2001, vol.18, p. 593-605. ISSN 0737-4038. [doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003840](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003840)
11. SHUTOV, A.D., KAKHOVSKAYA, I.A. Evolution of seed storage globulins and cupin superfamily. In: *Mol. Biol. (Moscow)*, 2011, vol.45, p.529-535. ISSN 0026-8933. [doi:10.1134/S0026893311030162](https://doi.org/10.1134/S0026893311030162)
12. 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. ISSN 0305-1048. [doi:10.1093/nar/gkg010](https://doi.org/10.1093/nar/gkg010)
13. PELE, M. Peanut allergens. In: *Romanian Biothechnol. Lett.*, 2010, vol.15(2), p. 5204-5212. ISSN 2248-3942.
14. SHIN, 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, vol.273, p. 13753-13759. ISSN 0021-9258. [doi:10.1074/jbc.273.22.13753](https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13753)
15. RABJOHN, P. et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. In: *J. Clin. Invest.*, 1999, vol.103, p. 535-542. ISSN 0021-9738. [doi:10.1172/JCI5349](https://doi.org/10.1172/JCI5349)
16. HELM, R.M. et al. A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, vol.123, p. 205-212. ISSN 1018-2438. [doi:10.1159/000024445](https://doi.org/10.1159/000024445)
17. 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. [doi:10.1134/S000629791510017X](https://doi.org/10.1134/S000629791510017X)
18. NIKLAS, K. J., KUTSCHERA, U. The evolution of the land plant life cycle. In: *New Phytol.*, 2010, vol.185, p.27-41. Online ISSN: 1469-8137. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03054.x
19. SHUTOV, A.D., VAINTRAUB, I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. In: *Phytochemistry*, 1987, vol.26, p. 1557-1566. ISSN 0031-9422. [doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82245-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82245-1)

20. 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, vol.241, p. 221-228. ISSN 0014-2956. [doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0221t.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0221t.x).
21. TANDANG-SILVAS, M.R. et al. Expression, Purification And Preliminary Crystalliz Amaranth 11S Proglobulin Seed Storage Protein From *Amaranthus Hypochondriacus* L. In: *J. Acta Cryst. Section F*, 2010, vol.66(PT8), p. 919-922. ISSN 2053-230X. doi.org/10.1107/S1744309110021032.
22. TANDANG-SILVAS, M.R. et al. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. In: *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol.1804(7), p. 1432-1442. ISSN 0304-4165. [doi:10.1016/j.bbapap.2010.02.016](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.016).
23. LAWRENCE M.C. Structural relationships of 7S and 11S globulins. In: Seed proteins. P.R.Shewry, R. Casey (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999: 517-541. ISBN 978-94-011-4431-5
24. WICHES, 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. [doi:10.1021/jf049697o](https://doi.org/10.1021/jf049697o).
25. КЕРДИВАРЭ, А., КАХОВСКАЯ, И., ШУТОВ, А. Эволюционные предшественники запасных глобулинов семян в геномах зеленых водорослей и бактерий. Conferința științifică națională consacrată jubileului de 90 de ani din ziua nașterii academicianului B. Melnic. USM, 12 februarie 2018, p. 222-225. ISBN 978-9975-71-971-1.
26. CHERDIVARA, A.M. et al. Limited proteolysis regulates massive degradation of ginnacin, storage 11S globulin from ginkgo seeds. In: *Molecular Life* [online], Romania, 2018, vol. 2, p. 2-6. ISSN 2559-611X. [doi:10.26600/MolLife.1.2.1.2018](https://doi.org/10.26600/MolLife.1.2.1.2018)
27. КЕРДИВАРЭ, А. et al. Роль ограниченного протеолиза в инициации массивной деградации запасных 11S глобулинов семян. În: Materialele Conferinței științifice Internaționale "Genetica, fiziologia și ameliorarea palntelor". (Ediția a VI-a), AȘM, Chișinau, 9-10 octombrie 2017, p.26-29. ISBN 978-9975-56-46-36-2
28. CHERDIVARĂ, A., RUDAKOVA, A., ȘUTOV A. Globulinele de rezervă 7S din semințe ca alergeni. Imunoreactivitatea încrucișată între globulinele de rezervă 7S și 11. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2016, nr.1 (91), p.56-60. ISSN 1814-3237
29. CHERDIVARĂ, A., RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., ȘUTOV, A. Proteoliza limitată a alergenului Ara h1, globulina de rezervă 7S din semințele de arahide. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2016, nr.6(96), p.10-15. ISSN 1814-3237.
30. CHERDIVARA, A. Limited proteolysis as a means to reduce the allergenicity of seed storage globulins. In: *Agricultural Biology*, 2018, vol. 53, p. 475-484. ISSN 2412-0324. [doi:10.15389/agrobiology.2018.3.475eng](https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.475eng)
31. CHERDIVARĂ, A., RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., ȘUTOV, A. Alergenul Ara h3, globulina de rezervă din semințele de arahide. 1. Proteoliza limitată cu papaină. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2017, nr.1(101), p.37-40. ISSN 1814-3237
32. CHERDIVARĂ, A., RUDAKOVA, A., ȘUTOV, A. Globulinele de rezervă 11S ca alergeni. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2015, nr.6 (86), p.9-11. ISSN 1814-3237

33. **CHERDIVARĂ, A.**, RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., ȘUTOV, A. Alergenul Ara h3, globulina de rezervă din semințele de arahide. 2. Proteoliza limitată cu tripsină. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2017, nr.1(101), p.41-45. ISSN 1814-3237
34. **CHERDIVARĂ, A.** Imunoreactivitatea încrucișată potențială a globulinelor de rezervă din semințe. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2017, nr.6 (106), p. 19-23. ISSN 1814-3237

LISTA LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Articole în reviste științifice

În reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. 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. [doi: 10.1134/S000629791510017X](https://doi.org/10.1134/S000629791510017X)

În reviste din străinătate recunoscute

2. **CHERDIVARA, A.** Limited proteolysis as a means to reduce the allergenicity of seed storage globulins. In: *Agricultural Biology*, 2018, vol. 53, p. 475-484. ISSN 2412-0324. [doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.475eng](https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.475eng)
3. **CHERDIVARA, A.M.**, STEPURINA, T.G., RUDAKOVA, A.S., RUDAKOV, S.V., WILSON, K.A., SHUTOV, A.D. Limited proteolysis regulates massive degradation of ginnacin, storage 11S globulin from ginkgo seeds. In: *Molecular Life* [online], Romania, 2018, vol. 2, p. 2-6. ISSN 2559-611X. [doi: 10.26600/MoLife.1.2.1.2018](https://doi.org/10.26600/MoLife.1.2.1.2018)

În reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B

4. **CHERDIVARĂ, A.**, RUDAKOVA, A., ȘUTOV, A. Globulinele de rezervă 11S ca alergeni. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2015, nr.6 (86), p.9-11. ISSN 1814-3237
5. **CHERDIVARĂ, A.**, RUDAKOVA, A., ȘUTOV A. Globulinele de rezervă 7S din semințe ca alergeni. Imunoreactivitatea încrucișată între globulinele de rezervă 7S și 11. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2016, nr.1 (91), p.56-60. ISSN 1814-3237
6. **CHERDIVARĂ, A.**, RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., ȘUTOV, A. Proteoliza limitată a alergenului Ara h1, globulina de rezervă 7S din semințele de arahide. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2016, nr.6(96), p.10-15. ISSN 1814-3237
7. **CHERDIVARĂ, A.**, RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., ȘUTOV, A. Alergenul Ara h3, globulina de rezervă din semințele de arahide. 1. Proteoliza limitată cu papaină. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2017, nr.1(101), p.37-40. ISSN 1814-3237
8. **CHERDIVARĂ, A.**, RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., ȘUTOV, A. Alergenul Ara h3, globulina de rezervă din semințele de arahide. 2. Proteoliza limitată cu tripsină. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2017, nr.1(101), p.41-45. ISSN 1814-3237
9. **CHERDIVARĂ, A.** Imunoreactivitatea încrucișată potențială a globulinelor de rezervă din semințe. În: *Studia Universitatis*, seria Științe reale și ale naturii. 2017, nr.6 (106), p.19-23. ISSN 1814-3237

Teze în culegeri științifice

În lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

10. РУДАКОВА, А.С., **КЕРДИВАРЭ, А.М.**, РУДАКОВ, С.В., ШУТОВ, А.Д. Запасные глобулины семян как аллергены. В: Материалы Всероссийской конференции с

международным участием «Агроэкосистемы в естественных и регулируемых условиях: от теоретической модели к практике прецизионного управления». Санкт-Петербург (Россия), 21-23 сентября, 2016, стр. 386-390. ISBN 978-5-905200-32-8

11. RUDAKOVA, A.S., CHERDIVARA, A.M., RUDAKOV, S.V., WILSON, K.A., SHUTOV, A.D. Limited proteolysis regulates massive degradation of seed storage globulins. В: Материалы Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от современных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего». Санкт-Петербург (Россия), 27-29 сентября, 2017, стр. 436-438. ISBN 978-5-905200-34-2
12. КЕРДИВАРЭ, А.М. Перспективы снижения аллергенности запасных глобулинов семян протеолизом. В: Материалы Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от современных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего». Санкт-Петербург (Россия), 27-29 сентября, 2017, стр. 432-435. ISBN 978-5-905200-34-2

În lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

13. КЕРДИВАРЭ, А., СТЕПУРИНА, Т., РУДАКОВА, А., РУДАКОВ, С., ВИЛСОН, К., ШУТОВ, А. Роль ограниченного протеолиза в инициации массивированной деградации запасных 11S глобулинов семян. În: Materialele Conferinței științifice Internaționale "Genetica, fiziologia și ameliorarea palntelor". (Ediția a VI-a), AȘM, Chișinău, 9-10 octombrie 2017, p.26-29. ISBN 978-9975-56-46-36-2
14. CHERDIVARA, A., RUDAKOVA, A., RUDAKOV, S., KAKHOVSKAYA, I., SHUTOV, A. Limited proteolysis of seed storage globulins in relation to their allergenicity. The International Congress on Oil and Protein Crops. Meeting of the EUCARPIA Oil and Protein Crops Section, May 20-24, 2018 Chisinau, p. 149. ISBN 978-9975-3178-5-6

În lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

15. CHERDIVARĂ, A. Alergenicitatea globulinelor de rezervă 11S din semințele de arahide și soia. Conferința științifică națională cu participare internațională *Integrare prin cercetare și inovare* USM, 10-11 noiembrie 2015. Rezumate ale comunicărilor Științe ale naturii, Științe exacte. p.108-111. ISBN 978-9975-71-705-2
16. CHERDIVARĂ, A., RUDAKOV, S., RUDAKOVA, A. Proteoliza limitată ca modalitatea de reducere a alergenității globulinei de rezervă 7S din semințele de arahide. Conferința științifică națională cu participare internațională *Integrare prin cercetare și inovare* USM, 28-29 septembrie 2016. Rezumate ale comunicărilor Științe ale naturii, Științe exacte. p.74-77. ISBN 978-9975-71-814-1
17. CHERDIVARĂ, A. Evoluția structurii, legitățile proteolizei și alergenicitatea globulinelor de rezervă din semințe. Conferința științifică națională cu participare internațională *Integrare prin cercetare și inovare* USM, 9-10 noiembrie 2018. Rezumate ale comunicărilor Științe ale naturii, Științe exacte. p.43-46. ISBN 978-9975-142-49-6

În lucrările conferințelor științifice naționale

18. КЕРДИВАРЭ, А., КАХОВСКАЯ, И., ШУТОВ, А. Эволюционные предшественники запасных глобулинов семян в геномах зеленых водорослей и бактерий. Conferința științifică națională consacrată jubileului de 90 de ani din ziua nașterii academicianului B. Melnic. USM, 12 februarie 2018, p. 222-225. ISBN 978-9975-71-971-1

ADNOTARE

la teza „**Globulinele de rezervă 7S și 11S din semințe: evoluție, proteoliză, alergenicitate**” prezentată de Cherdivară Ala în vederea solicitării gradului științific de doctor în științe biologice. Chișinău, 2020

Teza include introducere, patru capitole, concluzii generale, recomandări și lista lucrărilor citate. Lucrarea conține 116 pagini de text, 64 de figuri și 14 tabele. Referințele includ 120 de surse. Rezultatele obținute sunt publicate în 18 lucrări științifice (9 articole și 9 teze la conferințe).

Cuvinte-cheie: globuline de rezervă din semințe, legumine, viciline, germine, evoluție, ginkgo, oxalat-decarboxilaza, structurile primare și superioare ale proteinelor, mecanisme de proteoliză, proteoliză limitată, cinetica proteolizei, alergenicitate, arahide.

Scopul lucrării: Studiarea legăturilor formării structurii conservative a globulinelor de rezervă din semințe în timpul evoluției, stabilirea mecanismului degradării proteolitice profunde a acestora și analiza perspectivelor de utilizare a proteolizei limitate a globulinelor de rezervă pentru a reduce nivelul de alergenicitate a acestora.

Obiectivele lucrării: 1) Analiza relațiilor filogenetice dintre globulinele de rezervă din semințe și proteinele structural omoloage ale procariotelor și eucariotelor. 2) Stabilirea etapelor succesive în formarea structurii globulinelor de rezervă, care determină funcția lor în semințe. 3) Studiarea cineticii proteolizei globulinei de rezervă 11S din semințele de ginkgo *Ginkgo biloba*, unul dintre cei mai vechi reprezentanți ai spermatofitelor și descrierea mecanismului de reglare a degradării lor proteolitice profunde. 4) Studiarea reacțiilor succesive a proteolizei limitate ale globulinelor 11S și 7S din arahide *Arachis hypogaea*, semințele cărora au un nivel ridicat de alergenicitate. 5) Stabilirea modificărilor structurale în globulinele 11S și 7S în timpul proteolizei și analiza posibilității de reducere a alergenității globulinelor de rezervă din arahide prin proteoliza limitată.

Noutatea și originalitatea științifică a lucrării: Pentru prima dată, s-a stabilit că precursorii străvechi evolutivi ai globulinelor de rezervă din semințe sunt oxalat-decarboxilazele bacteriene. S-a arătat că precursorii străvechi vegetali ai globulinelor de rezervă din semințe sunt proteinele din algele verzi *Klebsormidium nitens*. S-a constatat că structurile primare și terțiare ale globulinelor 11S reflectă cele mai vechi trăsături ale proteinelor de rezervă din semințe. S-a demonstrat că proteoliza limitată a globulinei 11S din semințele de ginkgo inițiază degradarea sa masivă prin mecanismul „una câte una”. Pe baza analizei structurilor cristaline ale globulinelor 11S, este prezentat rolul reglator al proteolizei limitate în degradarea masivă a acestor proteine. S-au studiat legăturile proteolizei limitate ale globulinelor 11S și 7S din semințele de arahide. S-a stabilit că proteoliza limitată duce la îndepărtarea regiunilor structurii primare ale globulinelor 11S și 7S din arahide, care determină alergenitatea lor.

Rezultatul obținut, care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în stabilirea originii globulinelor de rezervă din semințe din oxalat-decarboxilazele bacteriene și rolului de reglare al proteolizei limitate în degradarea lor profundă. S-a demonstrat că proteoliza limitată a proteinelor de rezervă din semințe duce la eliminarea determinantilor antigenici (epitopii IgE) din structurile lor primare, ceea ce este promițător din punct de vedere al creșterii siguranței produselor alimentare, care conțin proteine de rezervă din semințe.

Semnificația teoretică a lucrării: S-a stabilit originea globulinelor de rezervă din semințe din oxalat-decarboxilazele bacteriene și nu din sferulinele Amoebozoa, după cum s-a presupus anterior. S-a stabilit rolul proteolizei limitate în reglarea degradării proteolitice masive a globulinei 11S din ginkgo, unul dintre cei mai vechi reprezentanți ai spermatofitelor. Rezultatele obținute sugerează un mecanism comun pentru reglarea proteolizei proteinelor de rezervă, caracteristic pentru întreaga familie de globuline 11S din semințe.

Semnificația aplicativă a lucrării: Sunt prezentate perspectivele proteolizei limitate ca o modalitate de a reduce semnificativ nivelul de alergenicitate al proteinelor de rezervă din semințele de arahide, precum și a mai multor alte plante.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele expuse în lucrare reprezintă material științifico-didactic pentru cursurile de biochimie și proteomică.

SUMMARY

of the thesis “7S and 11S seed storage globulins: evolution, proteolysis, allergenicity” presented by Cherdivară A.M. for the scientific degree of Doctor in Biology, Chisinau, 2020

The thesis consists of introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, and a list of references. The work contains 116 pages of the text, 64 figures, 14 tables and the list of references that includes 120 sources. The obtained results were published in 18 scientific papers (9 articles and 9 reports at conferences).

Key words: seed storage globulins, legumin, vicilin, germin, oxalate decarboxylase, evolution, protein primary and higher order structures, proteolysis mechanisms, limited proteolysis, proteolysis kinetics, allergenicity, ginkgo, peanut.

Aim of the study: Investigation of the regularities of formation during evolution of the conserved structure of seed storage globulins, establishment of the mechanism of their deep proteolytic degradation and elucidation of the prospects for the use of limited proteolysis of storage globulins to reduce the level of their allergenicity.

The objectives of the study. 1) To analyze phylogenetic relationships between sequences of seed storage globulins and related proteins of prokaryotes and eukaryotes. 2) To establish successive stages in the evolution of the structure of storage globulins that determine their function. 3) To study the kinetics of proteolysis of the storage 11S globulin of ginkgo *Ginkgo biloba*, one of the most ancient representatives of spermatophytes, and to describe the mechanism of regulation of deep proteolytic degradation of 11S globulins. 4) To study the successive reactions of limited proteolysis of 11S and 7S globulins from peanut *Arachis hypogaea*, whose seeds are known for a high level of allergenicity. 5) To establish structural changes in 11S and 7S globulins during proteolysis and assess the possibility of reducing the allergenicity of peanut storage globulins by limited proteolysis.

Scientific novelty and originality of the work. It was established for the first time that bacterial oxalate decarboxylases represent statistically reliable most ancient precursors of seed storage globulins. It was demonstrated that proteins from the green algae *Klebsormidium nitens* represent the most ancient plant precursors of seed storage globulins. It was shown that the primary and higher order structures of 11S globulins reflect the most ancient features of seed storage globulins. It was demonstrated that the limited proteolysis of 11S globulin from ginkgo seeds initiates massive degradation of the protein via one-by-one mechanism. Based on the analysis of crystal structures of 11S globulins, the regulatory role of the limited proteolysis in the massive degradation of these proteins was shown. Regularities of limited proteolysis of 11S and 7S globulins from pumpkin seeds were studied. It was demonstrated that limited proteolysis leads to the removal of the primary structure regions of peanut 11S and 7S globulins, which determine their allergenicity.

The obtained result, which contributes to the solution of an important scientific problem, is to establish the origin of seed storage globulins from bacterial oxalate decarboxylases and the regulatory role of limited proteolysis in their deep degradation. It has been shown that limited proteolysis of seed storage globulins leads to the removal of antigenic determinants (IgE epitopes) from their primary structures, which is promising from the point of view of increasing the safety of food products containing seed proteins.

Theoretical significance of the work. The origin of seed storage globulins from bacterial oxalate decarboxylases, rather than from Amoebozoa spherulins as assumed previously, was shown statistically faithfully. The role of limited proteolysis in the regulation of massive proteolytic degradation of 11S globulin from ginkgo, one of the oldest representatives of seed plants, has been established. The results obtained suggest a common mechanism for the regulation of proteolysis of storage proteins characteristic of the entire family of 11S seed globulins.

Practical significance of the work. The availability of the limited proteolysis as a means of a significant decrease of the allergenicity level of storage globulins from pumpkin seeds, as well as from seeds of other plants, were shown.

Implementation of scientific results. The results presented in the paper represent scientific-didactic material for the courses of biochemistry and proteomics.

АННОТАЦИЯ

диссертации Кердиварэ А.М. «Запасные 7S и 11S глобулины семян: эволюция, протеолиз, аллергенность», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинев, 2020

Диссертация состоит из введения, четырех глав, общих выводов, рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа состоит из 116 страниц текста, 64 рисунков и 14 таблиц. Список литературы включает 120 источников. Полученные результаты опубликованы в 18 научных работах (9 статей и 9 докладов на конференциях).

Ключевые слова: запасные глобулины семян, леугмин, вицилин, джермин, оксалат-декарбоксилаза, эволюция, первичная и высшие структуры белков, механизмы протеолиза, ограниченный протеолиз, кинетика протеолиза, аллергенность, гинкго, арахис.

Цель исследования: Исследование закономерностей формирования в ходе эволюции консервативной структуры запасных глобулинов семян, установление механизма их глубокой протеолитической деградации и выяснение перспектив использования ограниченного протеолиза запасных глобулинов для снижения уровня их аллергенности.

Задачи исследования: 1) Провести анализ филогенетических взаимоотношений между последовательностями запасных глобулинов семян и родственных белков прокариот и эукариот. 2) Установить последовательные этапы эволюции структуры запасных глобулинов, определяющие их функцию. 3) Исследовать кинетику протеолиза запасного 11S глобулина гинкго *Ginkgo biloba*, одного из древнейших представителей сперматофитов и описать механизм регуляции глубокой протеолитической деградации 11S глобулинов. 4) Изучить последовательные реакции ограниченного протеолиза 11S и 7S глобулинов арахиса *Arachis hypogaea*, семена которого известны высоким уровнем аллергенности. 5) Установить структурные изменения 11S и 7S глобулинов в ходе протеолиза и оценить возможности снижения аллергенности запасных глобулинов арахиса методом ограниченного протеолиза.

Научная новизна и оригинальность работы. Впервые установлено, что наиболее древними эволюционными предшественниками запасных глобулинов семян являются бактериальные оксалат-декарбоксилазы. Показано, что наиболее древними растительными предшественниками запасных глобулинов семян являются белки зеленой водоросли *Klebsormidium nitens*. Установлено, что первичная структура 11S глобулинов отражает наиболее древние признаки запасных белков семян. Показано, что ограниченный протеолиз 11S глобулина семян гинкго инициирует его массивную деградацию по поодиночному механизму. На основе анализа кристаллических структур 11S глобулинов показана регуляторная роль ограниченного протеолиза в массивной деградации этих белков. Изучены закономерности ограниченного протеолиза 11S и 7S глобулинов семян арахиса. Установлено, что ограниченный протеолиз приводит к удалению областей первичной структуры 11S и 7S глобулинов арахиса, определяющих их аллергенность.

Полученный результат, который способствует решению важной научной проблемы, заключается в установлении происхождения запасных глобулинов семян из бактериальных оксалат-декарбоксилаз и регуляторной роли ограниченного протеолиза в их глубокой деградации. Показано, что ограниченный протеолиз запасных глобулинов семян приводит к удалению из их первичных структур антигенных детерминант (IgE-эпитопов), что является перспективным с точки зрения повышения безопасности пищевых продуктов, содержащих белки семян.

Теоретическая значимость работы: Установлено происхождение запасных глобулинов семян из бактериальных оксалат-декарбоксилаз, а не из сферулинов Amoebozoa, как ранее предполагалось. Установлена роль ограниченного протеолиза в регуляции массивной протеолитической деградации 11S глобулина гинкго, одного из древнейших представителей семенных растений. Полученные результаты позволяют предполагать общность механизма регуляции протеолиза запасных белков, характерного для всего семейства 11S глобулинов семян.

Практическая значимость работы: Показана перспективность метода ограниченного протеолиза как способа существенного снижения уровня аллергенности запасных белков семян арахиса, а также ряда других растений.

Внедрение научных результатов. Результаты, изложенные в работе, представляют собой научно-образовательный материал для курсов биохимии и протеомики.

CHERDIVARĂ Ala

**GLOBULINELE DE REZERVĂ 7S ȘI 11S DIN SEMINȚE:
EVOLUȚIE, PROTEOLIZĂ, ALERGENICITATE**

163.02 Biochimie

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 22 octombrie 2020
Formatul hârtiei 60×84 1/16. Hârtie offset. Tipar offset.
Tiraj 40 ex. Coli de tipar: 2,0. Comanda nr. ...
Tipar executat: