



Albuminy 2S – roślinne białka zapasowe o właściwościach alergennych

Justyna Czarnecka¹, Maria Koziolkiewicz²

¹ Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska, Gdańsk

² Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

2S albumins – plant storage proteins and food allergens

Summary

Plant 2S albumins are known as storage proteins present in seeds of some edible plants such as soybean, sunflower, mustard and Brazil nuts. These proteins have unusual secondary structure resulting from the presence of cysteine-rich motif C-X_n-CX_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C and four disulphide bonds. Due to their structure, 2S albumins are stable to thermal processing and proteolysis. Some of the proteins have been identified as food allergens, but 2S albumins include also proteins of anti-inflammatory and antitumor activities. This review describes the properties and structures of the best characterized 2S albumins.

Keywords:

2S albumins, food allergens, SFA 8.

Adres do korespondencji

Maria Koziolkiewicz,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź;
e-mail:
markoz1@autograf.pl

biotechnologia

2 (77) 114–127 2007

1. Wstęp

W ciągu ostatnich 15-20 lat obserwuje się gwałtowny rozwój chorób alergicznych wywoływanych przez alergeny zawarte w produktach żywnościowych. Szacuje się, że w społeczeństwach krajów rozwiniętych z powodu alergii pokarmowych cierpi obecnie 1-2,5% dorosłych i aż 5-8% dzieci. Oznacza to, że tylko w krajach Unii Europejskiej z powodu alergii pokarmowych cierpi ok. 5-10 milionów ludzi. Alergenami pokarmowymi są

z reguły termostabilne, rozpuszczalne w wodzie białka o masie cząsteczkowej 10-70 kDa, które z powodu szczególnej struktury drugo- i trzeciorzędowej wykazują odporność na denaturację termiczną i degradację enzymatyczną. Dzięki temu zachowują epitopy niezbędne do interakcji z immunoglobulinami klasy IgE oraz IgG (1). Problemem zdrowotnym są nie tylko alergie spowodowane przez typowe alergeny pokarmowe, ale także alergie krzyżowe, do których dochodzi, jeśli pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi białek będących alergenami pokarmowymi albo wziewnymi istnieje przynajmniej 70% homologii (1).

Nie ulega wątpliwości, że w najbliższej przyszłości liczba alergików w społeczeństwach rozwiniętych będzie stale wzrastać (2). Z tego powodu alergeny pokarmowe, mechanizmy ich działania oraz sposoby obniżania właściwości alergennych stają się obiektem coraz większego zainteresowania zarówno naukowców jak i przemysłu.

2. Alergeny pokarmowe pochodzenia roślinnego

Wśród alergenów pokarmowych istotną grupę stanowią alergeny pochodzenia roślinnego. Do niedawna białka roślinne klasyfikowano na podstawie ich rozpuszczalności w różnych rozpuszczalnikach. Na tej podstawie Osborne (3), a w ślad za nim inni autorzy (4) wyróżnili albuminy (rozpuszczalne w wodzie), globuliny (rozpuszczalne w roztworach soli), prolamin (rozpuszczalne w mieszaninach wody i alkoholu) oraz gluteliny (rozpuszczalne w roztworach kwasów lub zasad). Ostatnio dokonano nowej klasyfikacji białek roślinnych – na podstawie ich znanej lub przypuszczalnej funkcji. Tej nowej klasyfikacji poddano białka dwóch modelowych roślin – ryżu i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (5). Najnowszej klasyfikacji białek roślinnych dokonano na podstawie ich podobieństwa strukturalnego i pokrewieństwa ewolucyjnego. Efektem tej klasyfikacji jest baza danych Pfam, która pod koniec 2006 r. obejmowała 8957 rodzin białek (wersja 21.0) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Według tej bazy ponad 50% alergenów roślinnych należy do dwóch nadrodzin, mianowicie do prolamin lub kupin. O ich alergenności decyduje przede wszystkim struktura drugorzędowa warunkująca odporność na obróbkę termiczną oraz degradację enzymatyczną. Chociaż alergenne działanie kupin udowodniono w przypadku soi i orzeszków ziemnych, udział tej grupy białek w alergenności innych nasion i orzechów pozostaje niejasny (5). Znacznie większe zainteresowanie wzbudzają w ostatnich latach białka należące do drugiej nadrodziny, mianowicie do prolamin. Przedmiotem opracowania będą wybrane białka należące do tej właśnie nadrodziny.

Nadrodzina prolamin obejmuje dwie rodziny białek. Pierwszą z nich stanowią właściwe prolamin, do których należą białka zapasowe zbóż. Charakteryzują się one wysoką zawartością proliny i glutaminy oraz obecnością powtarzających się wielokrotnie krótkich sekwencji peptydowych (np. PQQFPQQ lub PGQGQQ). Kon-

sekwencją tej szczególnej struktury pierwszorzędowej jest nietypowa struktura drugo- i trzeciorzędowa oraz odporność prolamin na degradację enzymatyczną. Podczas gdy alergenne właściwości tej grupy prolamin (m.in. glutenin i gliadyn wchodzących w skład glutenu) zostały już stosunkowo dobrze poznane, druga rodzina alergennych białek roślinnych (w tym: albuminy 2S) są obecnie przedmiotem szczegółowych badań. Ich charakterystyczną cechą jest obecność bogatego w reszty cysteiny motywu strukturalnego o następującej sekwencji aminokwasów: C-X_n-CX_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C (gdzie C oznacza cysteinę, a X – dowolny aminokwas) (6). Są to niskocząsteczkowe (poniżej 15 000 Da), bogate w siarkę inhibitory α -amylazy i trypsyny, niespecyficzne białka transportujące lipidy (nsLTP, ang. *non-specific Lipid Transfer Proteins*.) oraz tzw. albuminy 2S. Najlepiej poznano i opisano, jak dotychczas, albuminy 2S znajdujące się w nasionach roślin oleistych oraz w pulpie otrzymywanej jako produkt uboczny po ekstrakcji oleju.

3. Albuminy 2S

Albuminy 2S występują w nasionach wielu roślin użytkowych, takich jak soja, słonecznik, gorczyca czy orzech brazylijski, gdzie pełnią funkcje białek zapasowych (7). Ponieważ zawierają znaczne ilości metioniny i cysteiny, stanowią dla rozwijających się zarodków cenne źródło siarki i azotu. Ponadto albuminy 2S chronią ziarna roślin przed różnymi patogenami, m.in. hamują wzrost grzybów i bakterii oraz wykazują aktywność inhibitorów proteaz serynowych. Dodatkową barierą chroniącą zarodek jest antagonizm albumin w stosunku do kalmoduliny (białko biorące udział w przenoszeniu jonów wapnia) (8).

Albuminy, jako grupa białek roślinnych, zostały po raz pierwszy wyizolowane w 1924 roku przez Osborne'a, który wyróżnił je jako białka rozpuszczalne w wodzie (3). W 1981 r. Youle i Huang zdefiniowali tę grupę na podstawie współczynnika sedymentacji, który wynosi dla nich około 2S (9). Białka te są syntezowane w postaci pojedynczego polipeptydu, który jest przenoszony do światła retikulum endoplazmatycznego, gdzie podlega modyfikacjom potranslacyjnym, prowadzącym do powstania dwóch krótszych łańcuchów polipeptydowych połączonych czterema mostkami disiarczkowymi. Następnie białko jest transportowane do struktur Golgiego, a potem do wakuoli.

Cząsteczki albumin 2S zbudowane są zazwyczaj z dwóch podjednostek: mniejsza podjednostka zawiera 30-40 aminokwasów, a większa – 60-90 reszt aminokwasowych. Mają one charakterystyczną strukturą drugorzędową niespotykaną wśród innych białek. Konsekwencją tej nietypowej struktury jest duża stabilność albumin 2S oraz ich unikatowe właściwości, w tym także właściwości alergenne. Analizując strukturę trzeciorzędową albumin można stwierdzić, że łańcuch główny tworzący rdzeń białka formuje się w pięć helikalnych regionów (α -helis), które są względem siebie ułożone antyrównolegle i tworzą prawoskrętną superhelisę. Motyw ten

jest powszechnie spotykany nie tylko w albuminach 2S, ale także w niespecyficznych białkach przenoszących tłuszcze (nsLTPs, ang. *non-specific Lipid Transferring Proteins*), hydrofobowych białkach pochodzących z soi (HPS) oraz w inhibitorach α -amylazy (10). Regiony helikalne są połączone szkieletem cysteinowym usztywniającym strukturę cząsteczki. Osiem reszt cysteiny tworzy wspomniany już wzór: C-X_n-CX_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C, powtarzający się w każdym białku z tej grupy.

Oprócz dwóch charakterystycznych podjednostek, w budowie albumin można wyróżnić region zwany pętlą hiperróżnorodną. Pętla hiperróżnorodna (ang. *hypervariable loop*) znajduje się między helisą III i IV (w albuminach helisy liczy się następująco: Ia, Ib, II, III, IV; przy czym Ia i Ib tworzą małą podjednostkę, a pozostałe helisy tworzą dużą podjednostkę). „Hiperróżnorodny” region albumin 2S wykazuje wysoką zmienność pod względem długości i sekwencji aminokwasów. W tym miejscu często znajdują się epitopy decydujące o alergności białka.

Pomimo podobnej struktury drugo- i trzeciorzędowej albuminy 2S mają dość zróżnicowane właściwości alergenne. Najlepiej poznana dotychczas albumina 2S znana jako białko SFA 8 (pochodzące z nasion słonecznika) wykazuje niewielką alergność. Natomiast do najbardziej alergennych należą albuminy pochodzące z orzecha brazylijskiego. Przyczyną tych różnic są, być może, różne struktury pętli hiperróżnorodnych i wynikające z tego różnice w ich oddziaływaniach z przeciwciałami klasy IgE (10). Co więcej, preparat z frakcji albumin rącznika pospolitego (*Ricinus communis*) nie tylko nie jest alergenny, ale ma właściwości immunostymulujące. Ponadto w najnowszych badaniach wykazano, że wśród albumin 2S soi (*Glycine max*) znajduje się bioaktywny peptyd (lunazyna, ang. *lunasin*) o działaniu przeciwnowotworowym.

Określenie za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego trójwymiarowej struktury niektórych albumin (SFA 8, napiny BnIb z nasion rzepaku i białka RicC3 z nasion rącznika) (8,10-12) pozwoliło stwierdzić ich duże podobieństwo do innej grupy białek alergennych – nsLTP, które również charakteryzują się wysoką stabilnością oraz odpornością na denaturację termiczną i trawienie pepsyną (13). Analiza podobieństw i różnic pomiędzy albuminami 2S oraz białkami nsLTP może ułatwić wyjaśnienie przyczyn alergności i immunogenności tych białek. Przedstawiamy charakterystykę najlepiej dotychczas poznanych albumin 2S.

3.1. Albuminy 2S słonecznika

Albuminy 2S słonecznika określane skrótem SFAs (ang. *Sunflower Albumins*) są polimorficzną grupą składającą się z 8-13 białek, o masie cząsteczkowej od 10 do 18 kDa. Są to białka zasadowe, dla których punkt izoelektryczny (pI) wynosi ok. 8,8. Dotychczas określono sekwencję aminokwasową dwóch albumin słonecznika:

1) HaG 5 (od łacińskiej nazwy słonecznika – *Helianthus annuus*) o masie cząsteczkowej 15777Da i pI = 8,69, składającego się ze 134 aminokwasów;

2) SFA 8 (białko bogatego w metioninę) o masie cząsteczkowej 12133 Da i $pI = 5,91$, składające się z 103 aminokwasów (14).

Do tej pory nie udało się jednoznacznie stwierdzić czy albuminy słonecznika są alergenne, czy też za alergię powodowane spożyciem nasion słonecznika odpowiadają inne składniki. Mimo że albuminy SFA należą do grupy białek o wysokim stopniu alergenicności, to ogromne ich spożycie przy niewielkiej liczbie osób uczulonych na nasiona słonecznika nie pozwala tego problemu w sposób jednoznaczny wyjaśnić. Podejrzewa się, że powodem alergii w przypadku nasion słonecznika mogą być występujące w ziarnach białko nsLTP (15,16). Ponadto w badaniach dotyczących sposobu pobudzania komórek układu immunologicznego przez albuminę SFA 8 wykazano, że indukuje ona wytwarzanie takich czynników jak interleukina-12 (IL-12) oraz czynnik martwicy nowotworów TNF α (ang. *Tumor Necrosis Factor*) (17). Substancje te stymulują proliferację limfocytów grupy Th1 i jednoczesny wzrost poziomu interferonu- γ . Limfocyty Th1 mogą z kolei stymulować powstawanie wszystkich klas przeciwciał oprócz IgE. Na podstawie tych badań (17) sugeruje się, że albuminy słonecznika mogą pobudzać układ immunologiczny, jednakże nie jest to odpowiedź typowa dla pokarmowych reakcji alergicznych, ponieważ w tym przypadku obserwuje się zwiększony poziom immunoglobulin klasy IgE.

SFA 8 jest najlepiej, jak dotychczas, poznaną albuminą słonecznika. Składa się ze 103 aminokwasów, wśród których znajduje się bardzo duża liczba aminokwasów hydrofobowych: 16 reszt metioniny, 9 reszt leucyny, 3 reszty izoleucyny, 3 reszty tyrozyny, 2 reszty waliny i jedna reszta tryptofanu, co stanowi 30% aminokwasów tworzących białko (patrz tabela). Ponadto SFA 8 ma 13 reszt aminokwasowych ujemnie naładowanych (Asp i Glu) i 14 reszt aminokwasowych obdarzonych ładunkiem dodatnim. Większość z tych reszt jest ulokowana na powierzchni białka. W przeciwieństwie do innych albumin 2S, SFA 8 jest monomerem. W jej strukturze można wyróżnić 5 regionów o strukturze α -helikalnej stabilizowanych przez cztery mostki disiarczkowe, tworzące charakterystyczne dla albumin ugrupowanie. SFA 8 wykazuje niewielki stopień homologii w stosunku do sekwencji aminokwasowych innych albumin 2S. Warto jednak podkreślić, że swoją strukturą trzeciorzędową albumina ta w dużym stopniu przypomina białko rRicC3 (rekombinowane białko z nasion rącznika – *Ricinus communis* C3), chociaż istnieją pomiędzy nimi pewne różnice (np. liczba i ułożenie aminokwasów w pętli hiperróżnorodnej oraz liczba aminokwasów w helisie II) (8).

SFA 8 należy do białek o bardzo stabilnej strukturze, którą można rozfałdować stosując wysoką temperaturę (90°C) lub wysokie stężenie czynników denaturujących, np. 4 M roztwór chlorowodoru guanidyny. Proces fałdowania tego białka był poddany szczegółowej analizie, m.in. z wykorzystaniem dichroizmu kołowego i spektroskopii w podczerwieni (18,19). Zaobserwowano, że w obecności niewielkich stężeń czynników denaturujących ulega ono szybszemu fałdowaniu niż w wodzie. Prawdopodobnie białko to może ulegać fałdowaniu w dwojaki sposób.

Tabela

Sekwencje aminokwasowe wybranych albumin 2S

Źródło białka	Nazwa białka	Sekwencja aminokwasowa	
słonecznik	SFA 8	PYGRGRTESGCYQQMEEAEMLNHCGMYLMKNLGGERSQVSPRMREEDHKQLCCMQLKNLDEKCMC PAIMMMLNPEPMWIRMRDQVMSMAHNL PIECNLMSQPCQM	
		podjednostka	
		mała	duża
soja	rAL1	SKWQHQQESCRESQLKGINLNPCEHIMEKIQA GRRGEDGSDHILIR	RKKEGKEEEEEGHMQCCSEMSELKSPICQCK ALQKIMDNQSEQLGEGKQKMERELMNLAIAC RLGPMIGCDLSSDD
soja	AL3 (lunazyna)	SKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQA GRGDDDDDDDDN	EGKDEDEEEEGHMQCCCTEMSELRSPKCQCK ALQKIMENQSELEEKQKKMEKELINLATMC RFGPMIQCDLSSDD
rzepak	BnIb	QPQKCQREFQQEQHLRACQWIRQQLAGSPF	QSGPQQGPWLREQCCNELYQEDQVCVPTLK QAAKSVRVVGGQHGPQFQSTRIYQIAKNLPVNCN MKQIGTCPFIAI
rzącznik	rRic C3	AEFMESKGEREGSSSQCRQEVQRKDLSSCE RYLRQSSS RRSTGEEVLRMPGDENQ (łącznik)	QQESQQLQCCCNQVKQVRDECQCEAIKYAED QIQGQLHGEESERVAQRAGEIVSSCGVRCMR QTRTN
orzech brazylijski	Ber e 1	QEECREQMQRQMLSHCRMVMRQMEES	HCRRGMPEPHMSECCEQLEGMDDESCRCEGLR MMMMRMQEQEMQPRGEQMRRMMRLAENI PSRCNLSPMRCPMGGS

W środowisku wodnym łańcuchy boczne aminokwasów o charakterze niepolarnym formują rdzeń cząsteczki SFA 8, dodatkowo pewna liczba aminokwasów niepolarnych uczestniczy również w tworzeniu warstwy zewnętrznej. Polarne i niepolarne łańcuchy boczne aminokwasów układają się na powierzchni białka w sposób spolaryzowany. Tego rodzaju fałdowanie wymaga czasu i „łagodnych” warunków otoczenia. Istnieje opinia, że taki sposób fałdowania jest charakterystyczny dla tych białek roślin oleistych, które mają kontakt z olejem znajdującym się w nasionach. Sytuacja ulega zmianie, jeśli w środowisku znajdują się czynniki denaturujące. W zależności od stężenia i rodzaju czynnika denaturującego może on mieć wpływ na stabilność cząsteczek białka przyjmujących pewne przejściowe konformacje. W takiej sytuacji mogą wystąpić nietypowe interakcje hydrofobowe powodujące powstanie białka o innej niż zwykle konformacji. W tak sfałdowanym białku nie obserwuje się rdzenia cząsteczki złożonego z niepolarnych reszt aminokwasowych, ani też polarnych i niepolarnych regionów na powierzchni białka. Te nietypowe konformery charakteryzują się znacznym stopniem „wymieszania się” reszt polarnych i niepolarnych rdzenia i regionów powierzchniowych cząsteczki białka.

Być może, w obecności niewielkiej ilości czynników denaturujących nie ma warunków do zaistnienia oddziaływań hydrofobowych niezbędnych w procesie fałdo-

wania według pierwszego schematu (18) i powstaje konformer o znacznym stopniu „wymieszania się” reszt polarnych i niepolarnych. Charakterystyczną cechą tej nietypowej konformacji jest zmiana położenia pojedynczej reszty tryptofanu, która pojawia się na powierzchni cząsteczki białka, chociaż normalnie jest ukryta w jej rdzeniu. Opisane badania strukturalne są interesujące nie tylko z poznawczego punktu widzenia. Stwierdzono, że białko to ma silne właściwości emulgujące i z mieszaniem woda/olej tworzy stabilne emulsje (19). Z tego powodu SFA 8 może być wykorzystywane jako emulgator w przemyśle spożywczym (20).

3.2. Albuminy AL1 i AL3 soi

Od kilku lat albuminy 2S występujące w nasionach soi są obiektem dużego zainteresowania ze względu na wyodrębnioną z nich lunazynę (21). Stwierdzono, że obecna w nasionach soi frakcja albumin 2S składa się z dwóch różnych białek określanych jako AL1 i AL3. Pod względem sekwencji aminokwasowej białka te wykazują niewielką homologię w stosunku do innych członków rodziny albumin 2S, ale zawierają charakterystyczny układ mostków disiarczkowych tworzonych przez osiem cystein i łączących obie podjednostki. Stwierdzono, że albuminy soi charakteryzują się wysoką stabilnością i odpornością na denaturację termiczną oraz denaturację w obecności chlorowodoru guanidyny (22). Dotychczas nie stwierdzono ich właściwości alergicznych (23).

Albuminy wyizolowane z nasion soi różnią się w zdecydowany sposób od pozostałych albumin wysoką zawartością aminokwasów kwasowych. Zawartość kwasu asparaginowego w AL1 wynosi 5,66%, a w AL3 – 12,285%, natomiast ilość kwasu glutaminowego wynosi w AL1 16,99% oraz 15,38% w AL3. Sekwencja aminokwasowa obu albumin jest zamieszczona w tabeli. Albumina AL3 składa się z dwóch podjednostek: małej – złożonej z 43 aminokwasów i dużej złożonej z 77 aminokwasów. Podjednostki są połączone 17-aminokwasowym łącznikiem. Duża podjednostka ma masę 8 kDa i zawiera: 7,8% metioniny, 13% lizyny i 7,8% cysteiny. Mała podjednostka stanowi biologicznie aktywny peptyd – lunazynę, która ma właściwości przeciwnowotworowe. Została ona po raz pierwszy wyizolowana i zsekwencjonowana w 1987 r. (21). Stwierdzono, że pod jej wpływem w komórkach nowotworowych następuje zatrzymanie procesu mitozy, fragmentacja chromosomów oraz liza komórek (24).

W trzecim tygodniu po kwitnieniu w ziarnach soi pojawia się mRNA kodujący lunazynę, natomiast sam peptyd pojawia się w nich dopiero po pięciu tygodniach od kwitnienia. Jego zawartość jest przede wszystkim uwarunkowana odmianą soi. Nie stwierdzono jednoznacznie wpływu warunków uprawy oraz stopnia dojrzałości ziaren na ilość lunazyny w ziarnie. Jej zawartość w ziarnach soi wynosi 5,9-7,2 mg/g białka. Niestety, tendencja do selekcjonowania i uprawy odmian wysoko wydajnych doprowadziła do otrzymania odmian pozbawionych tego peptydu. Obecność luna-

zyny została również stwierdzona w ziarnach różnych odmian jęczmienia, gdzie jej zawartość wynosi 5,93-8,71 mg/g białka (od 14 do 21 $\mu\text{g/g}$ ziarna) (25,26).

Analizując sekwencję aminokwasową lunazyny warto zwrócić uwagę na obecność motywu RGD (arginina, glicyna i kwas asparaginowy), który umożliwia wiązanie się peptydu do powierzchni komórek zwierzęcych albo ludzkich. Motyw RGD występuje w białkach błonowych komórek nowotworowych i umożliwia tym komórkom wiązanie się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Lunazyna zawierająca motyw RGD konkuruje z komórkami nowotworowymi, chroniąc zdrowe narządy przed przerzutami. Należy zaznaczyć, że lunazyna pozbawiona tego motywu nie wykazuje właściwości przeciwnowotworowych i nie hamuje procesu mitozy (24).

Lunazyna po wejściu do komórki wnika do jądra, gdzie może wpływać na proces mitozy, jeśli przebiega on w obecności substancji kancerogennych. W jądrze komórkowym peptyd ten wiąże się z hipoacetylowaną chromatyną występującą w centromerze, a białka kompleksu kinetochoru ulegają odłożeniu w postaci agregatów. Związanie chromatyny zapobiega utworzeniu prawidłowego kompleksu kinetochoru w centromerze i prowadzi do zaburzeń mitozy, a w konsekwencji do śmierci komórki. Podobny sposób działania wykazują takie substancje przeciwnowotworowe jak: taksol, winblastyna, kolchicyna oraz nokodazol (24). Ponadto lunazyna hamuje acetylację histonów H3 i H4, co prowadzi do zahamowania transkrypcji w komórkach penetrowanych przez cząsteczki tego peptydu (27). W transformowanych komórkach poddanych działaniu lunazyny w początkowej fazie następuje nieprawidłowe wydłużenie włókien wrzeciona kariokinetycznego, a w późniejszym okresie niesymetryczny rozdział chromosomów przy jednej z centrioli, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki (24).

W warunkach *in vitro* lunazyna zapobiega transformacji nowotworowej komórek inicjowanej przez dimetylobenzantracen (DMBA), metylonitrozomocznik oraz metylonitrozoguanidynę, natomiast nie powoduje zmian w morfologii i proliferacji komórek pod nieobecność tych substancji (28). Trzeba jednak dodać, że pomimo licznych dowodów na przeciwnowotworową aktywność lunazyny, dotychczas nie wszczęto badań klinicznych ani nawet przedklinicznych.

3.3. Albuminy 2S nasion rzepaku

Izolat białkowy rzepaku, uzyskany jako produkt uboczny podczas tłoczenia oleju, składa się w 70% z globulin, w 30% z albumin oraz niewielkiej ilości kwasu fitynowego (około 1%). Albuminy rzepaku są białkami zasadowymi (pI wynosi ok.10), których sekwencja aminokwasowa wykazuje niski stopień homologii w stosunku do innych białek należących do tej rodziny. Białka 2S nasion rzepaku są bogate w struktury helikalne, a ich struktura trzyczłonowa jest stabilizowana przez cztery mostki disiarczkowe, charakterystyczne dla albumin. Jak wszystkie albuminy, są one syntezowane w postaci pojedynczego polipeptydu, który w wyniku późniejszej obróbki zostaje przekształcony w białko o dwóch podjednostkach.

Polimorficzna frakcja albumin 2S rzepaku określona mianem NT2SAs (ang. *napin-type 2S albumins*) obejmuje dwie frakcje białek o masie cząsteczkowej, odpowiednio, ok. 12 kDa oraz ok. 15 kDa. Frakcja niskocząsteczkowych albumin 2S rzepaku składa się w głównej mierze z białka Bnlb i niewielkich ilości Bnla. Albuminy 2S o wyższej masie cząsteczkowej zawierają białka oznaczone jako BnII, BnIII i BnIV. Wśród licznych albumin rzepaku najlepiej poznaną jest albumina Bnlb złożona ze 106 aminokwasów (tab.) (7,22).

W białku Bnlb występują cztery mostki disiarczkowe, utworzone przez następujące reszty cysteiny: 5-56, 58-101, 18-45 i 46-93. Na podstawie trójwymiarowego modelu można stwierdzić, że obserwowany w strukturze Bnlb układ helisy i pętli jest charakterystyczny dla albumin 2S. Bnlb zawiera 15 reszt aminokwasowych dodatnio naładowanych i 8 reszt naładowanych ujemnie. Hydrofobowe reszty aminokwasów ukryte są we wnętrzu białka (12).

Aby ułatwić i przyspieszyć badania nad strukturą i właściwościami Bnlb dokonano ekspresji jego prekursora w drożdżach *Pichia pastoris*. Otrzymana proteina (rproBnlb) jest dłuższa od białka naturalnego o trzy aminokwasy: Ser 32, Glu33 i Asn3. Ta część białka jest najprawdopodobniej usuwana z białka natywnego podczas obróbki posttranslacyjnej. Stwierdzono, że rproBnlb odznacza się znaczną odpornością na denaturację termiczną oraz na działanie enzymów proteolitycznych, co sugeruje jego właściwości alergenne. Na podstawie dodatkowych badań w tym kierunku stwierdzono, że w dwóch pętlach znajdują się alergenne epitopy (jeden w rejonie „pętli hiperróżnorodnej”) (12).

Albuminy rzepaku wykazują aktywność antagonistyczną w stosunku do kalmoduliny, za co odpowiedzialna jest mała podjednostka zawierająca motyw helisa-skręt-helisa. Motyw ten powoduje hamowanie aktywności kalmoduliny w wyniku inhibicji kompetycyjnej. Frakcja albumin rzepaku posiada właściwości stabilizujące pianę i emulsje, jednakże alergenne właściwości nie pozwalają na ich wykorzystanie w przemyśle spożywczym (30,31).

3.4. Rącznik pospolity

Rącznik pospolity (*Ricinus communis*) zwany w epoce średniowiecza *dłonią Chrystusa* jest cennym źródłem oleju, rycyny oraz albumin 2S. Albuminy 2S rącznika są kodowane przez pojedynczy mRNA, ale w wyniku translacji powstają dwa białka RicC1 i RicC3. Oba białka są złożone z mniejszej i większej podjednostki połączonych mostkami disiarczkowymi. Białko RicC1 ma masę 11,2 kDa, a RicC3 – 12 kDa. Białka te wykazują duże wzajemne podobieństwo pod względem sekwencji aminokwasowej (6,32).

RicC3 zawiera w swojej cząsteczce peptyd o właściwościach immunomodulujących. Preparat albumin rącznika jest dostępny handlowo jako lek o nazwie Immunoferon (znany również pod nazwą AM3). Jest to lek stymulujący układ odporno-

ściowy w odpowiedzi na infekcję wirusową lub bakteryjną. Jednocześnie wykazuje on działanie przeciwzapalne, gdyż działa hamująco na procesy uwalniania cytokin, np. TNF- α oraz interleukiny IL-6 (33,34).

Większość badań dotyczących albuminy RicC3 przeprowadzono wykorzystując białko rekombinowane, którego ekspresję uzyskano w bakteriach *Escherichia coli* (11). Rekombinowane białko rRicC3 różni się od białka naturalnego 16-aminokwasowym peptydem łączącym obie podjednostki. Łącznik ten nie występuje w natywnym białku RicC3, ponieważ jest usuwany w wyniku działania endopeptydaz i karboksypeptydaz. Obecność łącznika znacznie stabilizuje strukturę białka rRicC3, co umożliwiło określenie jego struktury metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (8). Białko rRicC3 składa się ze 125 aminokwasów, które tworzą małą podjednostkę [8-39], dużą podjednostkę [56-120] i łącznik [40-55]. Białko to charakteryzuje się wysoką zawartością aminokwasów hydrofobowych. Jego struktura jest usztywniona czterema mostkami disiarczkowymi.

Analizując sekwencję aminokwasową RicC3 stwierdzono, że zawiera ono 21 ujemnie naładowanych i 19 dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych. Większość z nich jest zlokalizowana na powierzchni białka i dostępna dla rozpuszczalnika. Natomiast reszty hydrofobowe są ukryte i upakowane w kilka skupisk wewnątrz cząsteczki białka (11). Sekwencję aminokwasową białka RicC3 przedstawiono w tabeli.

Badając alergenność białek RicC3 i rRicC3, poddawano je działaniu niskiego pH, enzymów proteolitycznych i chemicznej denaturacji. Stwierdzono, że w wymienionych warunkach (symulujących warunki panujące w układzie pokarmowym), albuminy rącznika cechują się wysoką stabilnością. W dodatkowych badaniach wykazano, że w obszarze pętli hiperróżnorodnej znajdują się epitopy charakterystyczne dla alergenów roślinnych, wobec czego białko to zostało zaliczone do białek alergennych (11).

3.5. Albuminy 2S orzecha brazylijskiego

Albuminy 2S orzecha brazylijskiego (*Bertholletia excelsa*) są frakcją polimorficzną składającą się z siedmiu izoform pojawiających się w nasionach po 9 miesiącach od okresu kwitnienia (35). Białka są syntezowane w postaci polipeptydów o masie 18 kDa, z których w następstwie obróbki potranslacyjnej powstają cząsteczki złożone z dwóch podjednostek: mniejszej o masie 3 kDa i większej o masie 9 kDa. Punkt izoelektryczny sześciu polipeptydów mieści się w zakresie od 4,6 do 6,6, natomiast pI jednego z polipeptydów wynosi powyżej 7,0. Albuminy 2S orzecha brazylijskiego charakteryzują się wysoką zawartością asparaginy, glutaminy, argininy oraz aminokwasów siarkowych: metioniny (~18%) i cysteiny (8%). Z tego powodu orzechy brazylijskie są uznawane za ważne źródło tych aminokwasów (36). Izoformy powstałe w wyniku obróbki potranslacyjnej różnią się przede wszystkim se-

kwencją aminokwasową fragmentów C-końcowych, co powoduje, m.in. różnice w zawartości metioniny (10-18%) (37).

W połowie lat dziewięćdziesiątych XX w. przeprowadzono próbę otrzymania transgenicznej soi wzbogaconej w albuminy orzecha brazylijskiego. W tym czasie alergenne właściwości albumin 2S orzecha nie były jeszcze w pełni udowodnione. Celem tych prac było podwyższenie zawartości metioniny oraz cysteiny w nasionach soi, ponieważ wartość odżywcza naturalnej soi jest w znacznym stopniu ograniczona przez niedobór tych aminokwasów. Otrzymano transgeniczną soję wzbogaconą w aminokwasy siarkowe, ale także bardziej alergenną niż soja naturalna. Na podstawie dokładnych badań wykazano, że białka orzecha obecne w nasionach zmodyfikowanej genetycznie soi nie zmieniły swych alergennych właściwości (38,39).

Albuminy 2S orzecha brazylijskiego są globularnymi białkami o zwartej budowie typowej dla tej rodziny (pięć α -helis połączonych czterema mostkami disiarczkowymi). Należą one do białek szczególnie odpornych na denaturację termiczną oraz degradację chemiczną lub enzymatyczną. Ich rozfałdowanie wymaga drastycznych warunków (5 M roztwór chlorowodoru guanidyny, pH 2) lub 1-godzinnej degradacji enzymatycznej, katalizowanej przez pepsynę (38). Co więcej, stwierdzono, że szkielet ośmiu reszt cysteiny z czterema mostkami disiarczkowymi na tyle stabilizuje strukturę fragmentu peptydowego powstającego podczas trawienia w żołądku, że nadal jest on zdolny do aktywacji limfocytów. Wysoka stabilność białka jest jednym z kryteriów uznania go za alergen. Na podstawie badań albumin 2S orzecha brazylijskiego dowiedziono, że zawierają one zarówno epitopy liniowe jak i konformacyjne (40).

Albuminy orzecha brazylijskiego są klasycznym alergenem, który łącząc się z immunoglobulinami powoduje reakcję alergiczną. Jej objawy mogą przybierać postać od łagodnych podrażnień w obrębie jamy ustnej i krtani aż do wstrząsu anafilatycznego. Alergie powodowane przez orzechy brazylijskie występują u osób wrażliwych przez całe życie, a jedynym sposobem uniknięcia reakcji alergicznej jest unikanie pożywienia zawierającego ten alergen. Dlatego ważne jest, aby żywność zawierająca nawet najmniejsze ilości orzechów lub zanieczyszczona nimi podczas produkcji była dobrze oznakowana. Wysoka odporność termiczna epitopów znajdujących się w orzechu brazylijskim, pozwala traktować albuminy 2S jako markery występowania orzechów w pożywieniu, niezależnie od procesów, jakim wcześniej poddano produkt (40,41).

4. Podsumowanie

Systematyczne badania albumin 2S prowadzone są zaledwie od kilku lat, ale wyniki tych prac świadczą, że są to białka o bardzo interesujących, choć zróżnicowanych właściwościach. Wiadomo, że albuminy 2S charakteryzują się wysoką zawartością takich aminokwasów jak: metionina, cysteina, arginina, asparagina i glutamina.

Z tego powodu geny kodujące albuminy 2S stały się obiektem zainteresowania genetyków, którzy wykorzystują je w celu otrzymania roślin transgenicznych o podwyższonej zawartości aminokwasów egzogennych. Tak np. geny kodujące albuminy 2S słonecznika wykorzystano, m.in. do zwiększenia zawartości metioniny i cysteiny w nasionach lucerny (*Medicago sativa* Taber) (42) i łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) (43). Jednak tego typu badania należy prowadzić z odpowiednią ostrożnością, ponieważ ze względu na alergiczne właściwości albumin 2S, efekt takich prac może być inny od oczekiwanego, czego przykładem są wyniki prac nad otrzymaniem transgenicznej soi, wzbogaconej w albuminy orzecha brazylijskiego (39). Albuminy 2S słonecznika, a w szczególności SFA 8, to białka o dużej zawartości aminokwasów hydrofobowych. Obecność hydrofobowych reszt na powierzchni SFA 8 jest ważnym czynnikiem stabilizującym emulsje, gdyż dzięki tym aminokwasom możliwa jest adsorpcja białka na granicy woda-olej. Układ taki jest stabilizowany przez hydrofobowe interakcje pomiędzy cząsteczkami białka i oleju (19,20). Badania nad albuminami słonecznika mają na celu, m.in. zastosowanie ich w przemyśle spożywczym do stabilizowania emulsji (dotychczas w tym celu wykorzystuje się białka mleka). Takie rozwiązanie pozwoliłoby wzbogacić żywność w egzogenne aminokwasy pochodzące z albumin słonecznika oraz umożliwiłoby spożywanie tak stabilizowanych produktów przez osoby uczulone na białka mleka.

Opisane albuminy 2S to jedynie wybrane przykłady białek tej rodziny. Ze względu na gospodarcze znaczenie roślin, w których występują (słonecznik i rzepak) lub silne właściwości alergiczne (albuminy orzecha brazylijskiego) zostały one zbadane lepiej niż wiele innych albumin 2S występujących w nasionach lub orzechach wielu roślin jadalnych. Na podstawie wyników najnowszych prac wskazuje się, że lista alergicznych albumin 2S może być znacznie dłuższa niż to wynika z dotychczasowych badań. Ostatnio znalazły się na niej albuminy 2S orzechów arachidowych (Ara h 2 oraz Ara h 6), albumina Ses i 1 z nasion sezamu oraz albumina Ana o 3 z orzecha nerkowca.

Charakterystyczna struktura drugo- i trzeciorzędowa albumin 2S powoduje, że są one wysoce odporne na denaturację termiczną, chemiczną i enzymatyczną. Jest to bezpośrednią przyczyną alergicznych właściwości tych białek. Ponieważ nasiona, w których występują albuminy 2S, stanowią ważny element naszej diety, a technologie stosowane dotychczas w przemyśle spożywczym nie eliminują alergicznych właściwości albumin 2S, już w niedalekiej przyszłości konieczne będzie opracowanie testów pozwalających wykryć w żywności nawet minimalne ilości tych alergenów.

Literatura

1. Papageorgiou P. S., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 901-906.
2. Crevel R., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 941-944.
3. Osborne T. B., (1924), *The vegetable proteins*, 2nd ed., Longmans Green and Co, London.
4. Danielsson C. E., (1949), *Biochem. J.*, 44, 387-400.

5. Mills E. N. C., Jenkins J., Marigheto N., Belton P. S., Gunning A. P., Morris V. J., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 925-929.
6. Shewry P. R., Beaudoin F., Jenkins J., Griffiths-Jones S., Mills E. N. C., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 906-910.
7. Shewry P. R., Napier J. A., Tatham A. S., (1995), *Plant Cell*, 7, 945-956.
8. Pantoja-Uceda D., Shewry P. R., Bruix M., Tatham A. S., Santoro J., Rico M., (2004), *Biochemistry*, 43, 6976-6986.
9. Youle R. J., Huang A. H. C., (1981), *Am. J. Bot.*, 68, 44-48.
10. Pantoja-Uceda D., Bruix M., Santoro J., Rico M., Monsalvet R., Villalba M., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 919-924.
11. Pantoja-Uceda D., Bruix M., Giménez-Gallego, Rico M., Santoro J., (2003), *Biochemistry*, 42, 13839-13847.
12. Pantoja-Uceda D., Palomares O., Bruix M., Villalba M., Rodriguez R., Rico M., Santoro J., (2004), *Biochemistry*, 43, 16036-16045.
13. van Ree R., (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30, 910-913.
14. González-Pérez S., Vereijken J. M., van Koningsveld G. A., Gruppen H., Voragen A. G. J., (2005), *J. Food Sci.*, 70, 98-102.
15. Pastorello E. A., Pompei C., Pravettoni V., Brenna O., Farioli L., Trambaioli C., Conti A., (2001), *Allergy*, 5, 45-47.
16. Kelly J. D., Hefle S. L., (2000), *Allergy*, 55, 556-559.
17. Kean D. E., Goodridge H. S., McGuinness S., Harnett M. M., Alcocer M. J. C., Harnett W., (2006), *J. Immunol.*, 177, 1561-1566.
18. Pandya M. J., Williams P. B., Dempsey C. E., Shewry P. R., Clarke A. R., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 26828-26836.
19. Pandya M. J., Sessions R. B., Williams P. B., Dempsey C. E., Tatham A. S., Shewry P. R., Clarke A. R., (2000), *Proteins*, 38, 341-349.
20. Burnett G. R., Rigby N. M., Mills E. N., Belton P. S., Fido R. J., Tatham A. S., Shewry P. R., (2002), *J. Colloid Interface Sci.*, 247, 177-185.
21. Odani S., Koide T., Ono T., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 10502-10505.
22. Lin J., Fido R., Marcos J. C., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1698, 203-212.
23. Lin J., Shewry P. R., Archer D. B., Beyer K., Niggemann B., Haas H., Wilson P., Alcocer M. J., (2006), *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 141, 91-102.
24. Galvez A. F., de Lumen B. O., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 495-500.
25. de Mejia E. G., Váscónes M., de Lumen B. O., Nelson R., (2004), *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5882-5887.
26. Jeong H. J., Lam Y., de Lumen B. O., (2002), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5903-5908.
27. Jeong H. J., Park J. H., Lam Y., de Lumen B. O., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7901-7906.
28. de Lumen B. O., (2005), *Nutr. Rev.*, 63, 16-21.
29. Palomares O., Monsalve R. I., Rodriguez R., Villalba M., (2002), *Eur. J. Biochem.*, 269, 2538-2545.
30. Rico M., Bruix M., González C., Monsalve R. I., Rodriguez R., (1996), *Biochemistry*, 35, 15672-15682.
31. Krause J., Schwenke K. D., (2001), *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 21, 29-36.
32. Bashir M. E., Hubatsch I., Leinenbach H. P., Zeppezauer M., Panzani R. C., Hussein I. H., (1998), *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115, 73-82.
33. Brieva A., Guerrero A., Alonsa-Lebrero J. L., Pivel J. P., (2001), *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1979-1987.
34. Ortega del Alamo P., Rivera Rodriguez T., Sanz Fernandez R., (2005), *Acta Otorrinolaringol. Esp.*, 56, 1-5.
35. Sun S. S., Altenbach S. B., Leung F. W., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 162, 477-483.
36. Koppelman S. J., Nieuwenhuizen W. F., Gaspari M., Knippels L. M. J., Penninks A. H., Knol E. F., Hefle S. L., de Jongh H. H. J., (2005), *J. Agric. Food Chem.*, 53, 123-131.
37. Moreno F. J., Jenkins J. A., Mellon F. A., Rigby N. M., Robertson J. A., Wellner N., Mills E. N. C., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1698, 175-186.
38. Saalbach G., Rosso M., Schumann U., (1996), *Plant Physiol.*, 112, 975-985.

39. Nordlee J. A., Taylor S. L., Townsend J. A., Laurie A. T., Bush R. K., (1996), *N. Engl. J. Med.*, 334, 688-692.
40. Alcocer M. J. C., Murtagh G. J., Wilson P. B., Progius P., Lim J., Archer D. B., (2004), *J. Mol. Biol.*, 343, 759-769.
41. Clemente A., Chambers S. J., Lodi F., Nicoletti C., Brett G. M., (2004), *Food Control.*, 15, 65-69.
42. Tabe L. M., Wardley-Richardson T., Ceriotti A., Aryan A., McNabb W., Moore A., Higgins T. J., (1995), *J. Anim. Sci.*, 73(9), 2752-2759.
43. Molvig L., Tabe L. M., Eggum B. O., Moore A. E., Craig S., Spencer D., Higgins T. J., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, (16), 8393-8398.