

Università di Roma Tor Vergata
Dipartimento di Biologia

Dottorato in
Biologia Cellulare e Molecolare
XVII ciclo

IDENTIFICAZIONE E LOCALIZZAZIONE DI ALLERGENI
IN POLLINE DI LECCIO (*Quercus ilex* L.)

Anna Mazzitelli

Anno Accademico 2004 – 2005

*alle mie nonne
che sono sempre con me*

Indice

Introduzione	pag 1
Allergie e pollinosi	1
Il polline: morfologia e allergeni	3
Aerobiologia e Monitoraggio pollinico	9
Pollinosi da Fagaceae	13
Scopo del lavoro	18
Materiali e Metodi	20
Monitoraggio pollinico a Tor Vergata dal 1996	20
Prelievo del sangue e separazione del siero	21
Purificazione frazione IgE	22
Raccolta del polline di leccio ed estrazione proteine	23
Estrazione proteine delle foglie di leccio	24
Identificazione immunologica degli allergeni: SDS-PAGE, Western Blotting, ELISA	25
Sequenziamento	27
Microscopia elettronica: Preparazione campioni per SEM e TEM	28
Colorazione con Acetato di Uranile e Citrato di Piombo, Thiery	29
Colorazioni citochimiche al MO	30
Immuno-oro marcatura	30
Risultati	32
Monitoraggio pollinico a Tor Vergata dal 2002 al 2004	32
Screening soggetti allergici adatti alla ricerca, monitoraggio delle allergie e test allergologici cutanei, prelievo di sangue e purificazione frazione IgE dal siero	34
Estrazione proteine di leccio, da polline e foglie	35
SDS-PAGE e Western Blotting	36
ELISA e ELISA con deglicosilazione	40
Sequenziamento	42
Indagini strutturali e ultrastrutturali del polline: il polline al SEM	43
Colorazioni citochimiche al MO	47
Polline al TEM e localizzazione degli allergeni dopo inclusione convenzionale e dopo freeze-substitution	48
Cross-reattività tra pollini di piante diverse	73
Discussione	76
Conclusioni	86
Summary	88
Bibliografia	92

Introduzione

Allergie e pollinosi

L'allergia è un disturbo immunitario caratterizzato da ipersensibilità a certi composti detti allergeni. Essa coinvolge le cellule di difesa del sangue e si realizza in due fasi: nella prima, l'allergene induce nelle cellule del sangue (linfociti B) una reazione con espressione di anticorpi specifici, immunoglobuline di classe E (IgE). I linfociti B differenziati in plasmacellule secernono le IgE specifiche che si legano ai recettori ad alta affinità per l'Fc (frammento costante della catena ϵ delle IgE), presenti sui mastociti tissutali e sui granulociti basofili del sangue. Nella seconda fase, quando l'individuo così sensibilizzato è esposto nuovamente all'allergene, questo si lega alle IgE di membrana provocandone l'aggregazione, che induce la degranulazione dei basofili e dei mastociti, e la conseguente liberazione di mediatori farmacologicamente attivi in grado di esercitare vari effetti biologici sui tessuti circostanti. Tra i mediatori chimici farmacologicamente attivi i più significativi sono l'istamina, le proteasi, il fattore chemiotattico per gli eosinofili e quello per i neutrofili, l'eparina. Mediatori secondari, derivati dalla digestione enzimatica dei fosfolipidi di membrana durante la degranulazione oppure sintetizzati dopo l'attivazione dei mastociti sono il fattore attivante le piastrine, i leucotrieni, le prostaglandine e varie citochine. Gli effetti principali di tali mediatori chimici sono la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità vasale e la contrazione della muscolatura liscia. I sintomi allergici si manifestano quali oculo-riniti, asma ecc. (Figura 1). (Kuby, 1994).

Tra le sostanze che possono scatenare allergie di tipo respiratorio, e che quindi si manifestano con rinite, congiuntivite, asma allergico o bronchite asmatica, figurano il polline, gli acari della polvere, le forfore e i peli di animali, muffe e spore di funghi. Un diverso tipo di reazione allergica è quella causata da alimenti e farmaci (allergia alimentare), cosmetici (allergia da contatto), punture di insetti. Questo tipo di allergeni possono causare sintomi di diversa severità, che vanno dalla dermatite o l'eczema, fino allo shock anafilattico (Knox e Suphioglu, 1996).

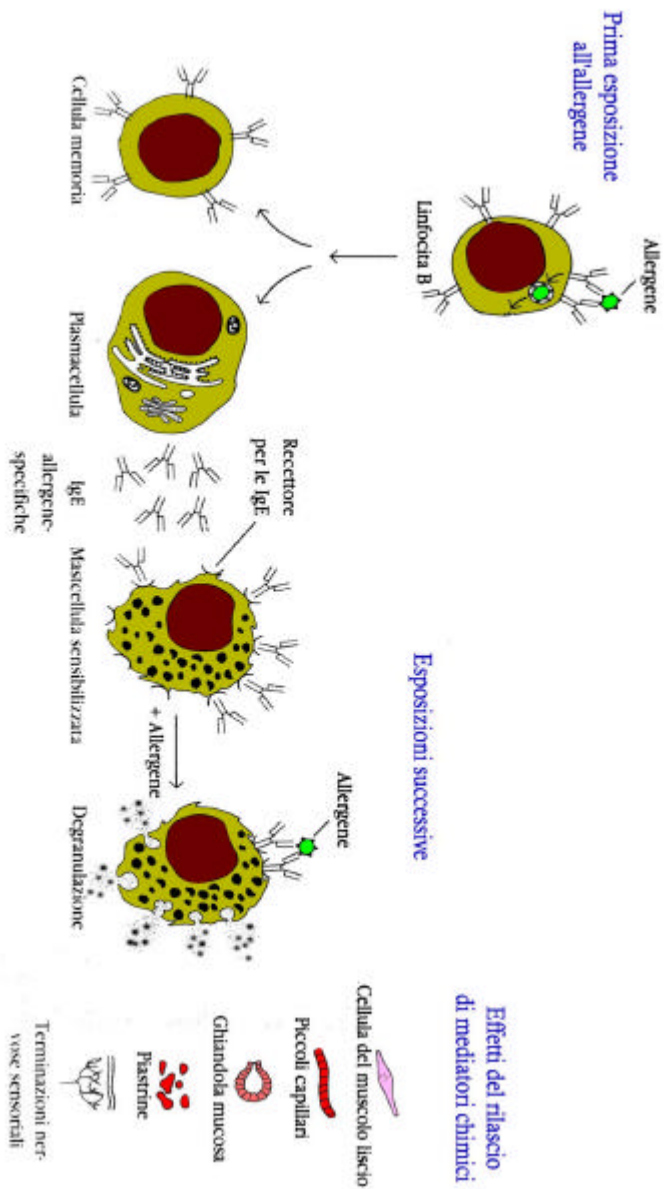


Fig. 1: Rappresentazione schematica della reazione allergica. (tratta da Kuby, 1994)

Il polline è un allergene ambientale. Le pollinosi, o allergie da polline, rappresentano una delle patologie causate dal polline aerodiffuso. L'incremento delle pollinosi negli ultimi decenni ha posto problemi di grande interesse, non solo per le conseguenze subite dai pazienti, ma anche a livello comunitario per le ingenti spese di diagnosi e terapie, e i riflessi negativi sull'economia del paese a causa della diminuzione di attività lavorative (European Allergy White Paper, 1997, Verlato *et al.*, 2003).

Si tratta di malattie dai contorni ancora in gran parte non chiari. Infatti, da una parte è aumentato il numero delle piante note che producono polline allergenico, dall'altra è aumentato il numero delle persone predisposte a tale patologia ad iniziare dall'età infantile o addirittura dallo stadio fetale (Wüthrich, 1989).

Di fronte al continuo incremento della percentuale di popolazione colpita, tutti i paesi comunitari ed extracomunitari si sono organizzati per identificare sistemi di prevenzione che riguardano da una parte i pazienti, dall'altra il polline allergenico. Tra i sistemi di prevenzione delle pollinosi, il più diffuso è quello basato sull'informazione del tipo di polline presente in un'area durante i vari mesi dell'anno. La carica pollinica è dipendente dalla quantità e qualità di polline liberato e dalle condizioni dell'aria, cioè dai parametri meteorologici che ne condizionano la sospensione nell'aria e la loro conservazione.

La determinazione dei pollini aerodiffusi avviene mediante cattura in appositi campionatori installati ad una determinata altezza da terra, e successivo riconoscimento e conteggio al microscopio ottico.

Il polline: morfologia e allergeni

Il polline è il gametofito maschile delle piante che si riproducono tramite seme (Spermatofite), cioè il tessuto che contiene i gameti maschili o le cellule madri dei gameti. (Gerola *et al.*, 1995).

La formazione del polline avviene nell'androceo, costituito da stami (filamento e antera che contiene le sacche polliniche), dove ha luogo la microsporogenesi. Le cellule più interne delle antere sono grandi e ricche di citoplasma, e vanno incontro a numerose divisioni mitotiche che determinano l'ingrossamento dell'antero stessa e la formazione del tessuto fertile detto archesporio. Ad un certo punto le mitosi si arrestano e l'archesporio appare formato da un numero elevato di sporociti, o cellule madri delle spore. Queste vanno incontro a divisione meiotica e ciascuna di

esse da origine a tetradi di androspore (o microspore), dalle quali poi avranno origine i granuli di polline (Gerola *et al.*, 1995). Dalla successiva divisione mitotica si formano i nuclei generativi e il nucleo vegetativo, i quali si rivestono di protoplasto e acquisiscono una parete che è prodotta in parte dallo sporofito (esina) e in parte dal gametofito stesso (intina) (Frenguelli *et al.*, 1991a). Il polline risulta costituito da una cellula vegetativa provvista di un nucleo che non si divide più, nel citoplasma della quale sono presenti numerosi organelli (mitocondri, proplastidi), e da una cellula generativa provvista di un numero molto ridotto di mitocondri, priva di proplastidi e altri organelli, e caratterizzata da un nucleo che si dividerà ancora per mitosi originando due nuclei spermatici o androgameti (Gerola *et al.*, 1995).

La composizione chimica del polline varia a seconda della specie, ma generalmente è costituita per il 13-37% da carboidrati, per l'11-20% da proteine, per l'1-4% da lipidi e per l'1-2% da componenti inorganici (Iwanami *et al.*, 1988).

Durante l'antesi fiorale dalle antere mature vengono liberati i granuli pollinici, che, per svolgere la loro funzione di fecondazione, devono raggiungere i fiori femminili della stessa pianta o di piante diverse della stessa specie. A tale scopo il polline viene trasportato dal vento (dispersione anemofila), da insetti (entomofila) o dall'acqua (idrocora). Per garantire la sua funzione il polline viene prodotto in grande quantità, soprattutto da quelle piante che affidano la dispersione al vento (Iwanami *et al.*, 1988).

Prima della dispersione il granulo pollinico subisce una completa disidratazione che lo rende più leggero facilitandone così il trasporto, e rallenta la sua attività metabolica, cosa che gli consentirà di sopravvivere in atmosfera per un lungo tempo nell'attesa di incontrare lo stimma del fiore femminile da fecondare (Gerola *et al.*, 1995). Campioni di polline sono stati raccolti fino a 700 km di distanza dal luogo della loro emissione e fino a 3,5 km in altezza nell'aria (Iwanami *et al.*, 1988).

Il rilascio del polline in atmosfera è una fase normale del ciclo sessuale delle piante anemofile, e il suo effetto è che il polline costituisce una porzione significativa del particolato aerodisperso (Knox e Suphioglu, 1996).

Il granulo pollinico è costituito da un protoplasma che contiene un nucleo vegetativo e uno o più nuclei generativi, ed è rivestito da una parete rigida e resistente che lo protegge dall'ambiente esterno nel momento della dispersione. Tale parete è composta da due parti, una più interna, l'intina prodotta dal polline stesso, di tipo cellulosico e proteico e una esterna,

l'esina, di origine sporofitica, costituita da polisaccaridi e sporopollenina. La sporopollenina è un eteropolimero che deriva dalla polimerizzazione ossidativa di carotenoidi, polifenoli e da esteri di carotenoidi (Brooks e Shaw, 1968). Tale struttura conferisce alla parete del granulo una grandissima resistenza all'attacco di patogeni e di agenti fisici e chimici e ne favorisce la conservazione anche per tempi lunghissimi (Gerola *et al.*, 1995). La sporopollenina è resistente anche all'acetolisi, cioè alla digestione con acidi forti (Erdtman, 1969).

La maggior parte dei granuli di polline maturo possiede delle aperture, cioè delle parti della parete in cui l'esina è più o meno assottigliata e che costituiscono una via di collegamento con l'ambiente esterno. Queste aperture consentono la funzione germinativa, permettendo la fuoriuscita del tubetto pollinico, inoltre consentono al polline di variare il proprio volume in relazione al suo stato di idratazione (Frenguelli *et al.*, 1991a). Le aperture possono essere di due tipi: i pori sono aperture circolari o leggermente ellittiche e presentano rapporto tra lunghezza e larghezza minore o uguale a 2, i colpi sono lesioni allungate simili a un solco con le estremità appuntite, e hanno rapporto tra lunghezza e larghezza maggiore di 2 (Feliziani, 1986).

I granuli pollinici delle diverse famiglie e generi di piante sono distinguibili l'uno dall'altro per le dimensioni, la forma che assume la deposizione della sporopollenina (sculturazioni), per l'aspetto e numero delle aperture che presentano, per la presenza di granuli di sporopollenina chiamati orbicoli che derivano dall'antera e che possono essere presenti sulla superficie esterna della parete.

In base alla assenza o presenza di aperture il polline è detto inaperturato o aperturato, in base al tipo di aperture si distinguono granuli porati (le aperture sono pori), colpati (le aperture sono dette colpi), o colporati (aperture composte sia da poro che da colpo.) (Frenguelli *et al.*, 1991a). Uno schema delle possibili disposizioni delle aperture dei granuli pollinici e della loro denominazione è riportato in figura 2a.

Le diverse sculturazioni che si riconoscono sulla superficie dei granuli pollinici sono il risultato dell'architettura della ectexina (strato esterno dell'esina). Uno schema che indica le possibili sculturazioni e la terminologia dei relativi granuli è riportato in figura 2b.

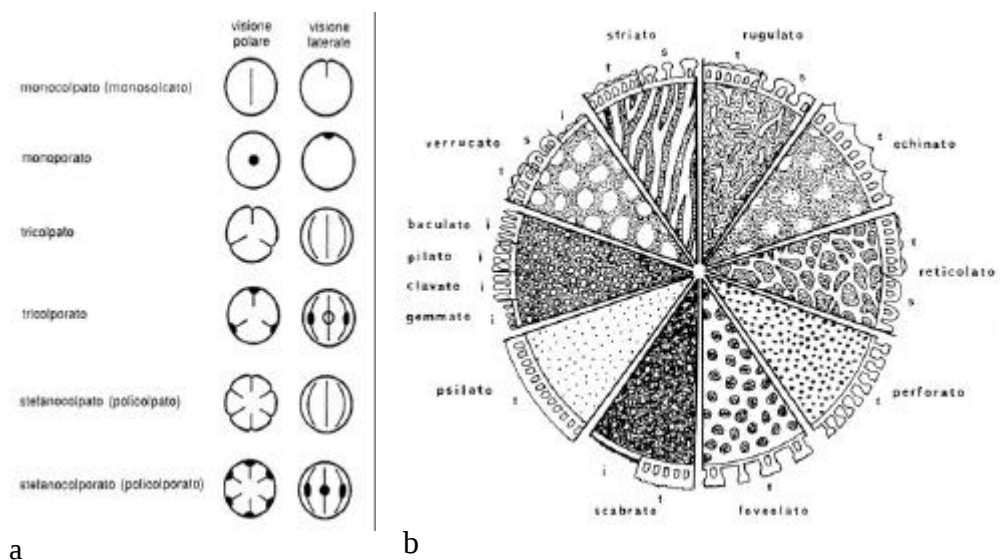


Fig. 2. a: Rappresentazione schematica e denominazione dei vari tipo di polline in base al numero e tipo delle aperture (da Gerola *et al.*, 1995). b: Tipi di sculturazione esinica e terminologia dei relativi granuli; le aree in rilievo sono mostrate chiare e le aree profonde sono mostrate scure. (t, granulo tectato; s, granulo semitectato; i, granulo intectato) (da Frenguelli *et al.*, 1991).

I granuli pollinici delle piante anemofile vengono liberati singolarmente (monadi) o come aggregati di più granuli (poliadi), ed hanno dimensioni comprese tra 10 e 200 μm (Feliziani, 1986).

A contatto con l'acqua il polline si idrata, aumenta di volume, riacquista la sua normale attività metabolica, e rilascia le molecole che erano state depositate nella sua parete o nel citoplasma durante lo sviluppo. Tali molecole sono proteine o glicoproteine, necessarie al riconoscimento specie specifico tra polline e stimma, proteine enzimatiche (cutinasi) che servono al polline per demolire la parete della papilla stigmatica, e proteine necessarie per la produzione e l'allungamento del tubetto pollinico che costituirà la via di accesso per i nuclei spermatici all'ovulo (Gerola *et al.*, 1995).

Non solo l'umidità dello stimma è in grado di idratare il polline e consentire la liberazione delle sue proteine, ma anche l'umidità atmosferica e l'umidità delle mucose delle vie respiratorie umane. I granuli di polline, una volta inalati, sono attaccati da enzimi presenti nelle secrezioni mucose, la

parete esterna viene dissolta e le molecole allergeniche rilasciate (Kuby, 1994).

Generalmente il polline causa di allergia è prodotto da piante che adottano l'impollinazione anemofila, in quanto presente in elevate quantità nell'aria durante il periodo di fioritura (Gramineae, Oleaceae, Betulaceae, Urticaceae ecc) (Knox e Suphioglu, 1996). Anche piante a impollinazione entomofila possono produrre polline potenzialmente allergenico, sebbene la probabilità che questo entri in contatto con le vie respiratorie di individui sensibili e determini una reazione allergica sia molto bassa. Ciò perchè il polline di tali piante viene prodotto in minori quantità, i granuli sono di dimensioni maggiori e più pesanti, spesso agglutinati tra loro da sostanze zuccherine, quindi meno adatti alla permanenza nell'aria. In condizioni particolari polline di Asteraceae, come il *Taraxacum* (Leporatti *et al.*, 2000), di Papaveraceae, come *Papaver rhoeas* L. (Leporatti *et al.*, 2000), di Tiliaceae come *Tilia platyphyllos* Scop (Bassett *et al.*, 1978) e di altre piante entomofile può dare origine a sensibilizzazioni e reazioni allergiche, come risultato di una dispersione nell'aria o per diretto contatto con la pianta nel momento della fioritura (Spieksma, 1990)

Le molecole allergeniche presenti nel granulo pollinico sono proteine o glicoproteine di varia natura e localizzazione. La loro caratteristica comune è quella di essere rapidamente rilasciate durante l'idratazione del granulo o a causa della sua rottura, e di interagire con il sistema immunitario di individui sensibili scatenando la reazione allergica. (Knox e Suphioglu, 1996, Knox *et al.*, 1998).

Generalmente le proteine allergeniche del polline hanno un peso molecolare compreso tra 5 e 70 kDa, e un punto isoelettrico acido, anche se non esistono caratteristiche comuni e univoche per tutti gli allergeni (Negri, 1992).

La nomenclatura internazionale adottata per gli allergeni prevede che il nome dell'allergene sia composto dalle prime tre lettere del nome del genere e la prima lettera del nome della specie di pianta da cui deriva, seguite da un numero. Ad esempio gli allergeni del polline di betulla (*Betula verrucosa* Ehrh.) si chiamano Bet v 1, Bet v 2 ecc. (Piao King *et al.*, 1994).

Gli allergeni pollinici sono localizzati, mediante tecniche di immuno-oro marcatura e osservazione al microscopio elettronico a trasmissione, in vari compartimenti del granulo stesso: la parete esterna, esina (Amb a 1) e intina (Bet v 1) (Knox e Suphioglu, 1996) o sugli orbicoli esterni presenti nel polline di talune Gimnosperme (Cup a 1) (Canini *et al.*, 2004) o Angiosperme (Bet v 7) (Vinckier e Smets, 2004), nel citoplasma (Lol p 1)

(Singh *et al.*, 1991), nei plastidi contenenti amido (Lol p 5) (Suphioglu *et al.*, 1992), nel reticolo endoplasmatico (Ole e 1) (Ong *et al.*, 1995), nelle zone citoplasmatiche ricche di ribosomi (Art v 1) (Grote *et al.*, 1998).

Gli studi effettuati per stabilire la funzione che le molecole allergeniche hanno all'interno del granulo pollinico sono basati sulla similarità di sequenza di tali allergeni con proteine a funzione nota. E' stato caratterizzato un gruppo di allergeni di cui il principale è l'allergene del polline di betulla, Bet v 1, che presenta grande similarità di sequenza con gli allergeni maggiori del polline delle altre piante appartenenti allo stesso ordine della betulla (Fagales), e che fa parte della famiglia di proteine detta "PR-protein", proteine legate alla patogenesi, che vengono espresse nelle risposte della pianta a stress e attacchi patogeni (Hoffmann-Sommergruber, 2000). Altri allergeni del polline di betulla sono Bet v 2, che ha sequenza simile alle profiline, proteine che legano l'actina e che sono coinvolte nella regolazione della forma delle cellule, nei movimenti citoplasmatici e nella trasduzione del segnale, e Bet v 3, proteina calcio legante (Seiberler *et al.*, 1994). L'allergene Phl p 5 (presente nel polline della Graminacea *Phleum pratense* L.) ha attività RNasica, sebbene non presenti similarità di sequenza con questo enzima (Knox e Suphioglu, 1996).

Gli individui sensibili ad un determinato allergene mostrano sintomi clinici che dipendono dal grado di allergenicità della molecola stessa. In base a questo tali molecole sono classificate come "allergeni maggiori", se determinano una reazione allergica nella maggior parte dei soggetti allergici, e "allergeni minori" se determinano la reazione allergica in un minor numero di pazienti (Negrini, 1992). Tale proporzione dipende dall'analisi clinica effettuata per stabilire la sensibilizzazione. In accordo con Marsh (1975) l'allergene è definito maggiore se determina il 90% di positività alle prove cutanee (prick test), e il 50% di positività mediante dosaggio delle IgE specifiche (Lowenstein, 1980). Un allergene è definito "minore" se determina il 20% o meno di sensibilizzazioni (Negrini, 1992).

Il polline di una specie allergenica può possedere più di una molecola che determina reazione allergica. Per esempio nel polline di olivo sono state identificate e caratterizzate 7 proteine allergeniche diverse, alcune delle quali risultano essere allergeni maggiori, altre sono considerate allergeni minori (Boluda *et al.*, 1998; Tejera *et al.*, 1999).

Le molecole allergeniche si legano alle IgE mediante specifiche regioni, chiamate epitopi di legame alle IgE ("IgE binding epitopes"), presenti sulla superficie delle proteine.

Il riconoscimento specifico degli allergeni pollinici da parte degli anticorpi IgE comporta che questi possano essere usati come una sonda specifica per gli allergeni. I soggetti allergici hanno tipicamente elevati livelli di IgE specifiche nel siero, che costituiscono una sonda per l'identificazione degli allergeni, per determinare la loro cross-reattività con allergeni di piante diverse, per l'isolamento dei geni che codificano per tali allergeni e per l'identificazione degli epitopi allergenici (Knox *et al.*, 1998).

I livelli sierici delle IgE in individui normali variano da 0,1 a 0,4 µg/ml. Nei soggetti allergici tali livelli superano 1 µg/ml. Benché l'emivita delle IgE nel siero sia di soli 2-3 giorni, una volta che esse sono legate ai loro recettori espressi sui mastociti e sui basofili diventano stabili per molto tempo (Abbas *et al.*, 2000).

Aerobiologia e Monitoraggio pollinico

L'aerobiologia è una scienza multidisciplinare che coinvolge la biologia, la fisica, la meteorologia, l'epidemiologia, la fitopatologia e la medicina, e che si occupa del trasporto in atmosfera di particelle di origine biologica (polline, spore, alghe, microrganismi), con particolare attenzione alle fonti di emissione, alla diffusione, alla deposizione e all'impatto su animali, piante e sull'uomo. Tra gli aspetti dell'aerobiologia si ricorda l'uso di particelle biologiche quali polline e spore, prodotte in grande quantità e facilmente identificabili, come traccianti per masse d'aria in grado di fornire indicazioni sulla circolazione atmosferica a piccola e grande scala (Main, 2003).

Uno dei campi dell'aerobiologia è il monitoraggio pollinico, che trova la sua più importante applicazione nella prevenzione delle allergie respiratorie, in quanto fornisce indicazioni puntuali e locali sulla quantità e qualità di polline presente nell'aria nei vari periodi dell'anno, consentendo una corretta diagnosi, un'efficace prevenzione dei sintomi e un uso limitato delle terapie farmacologiche e immunologiche (Mandrioli, 1998). Il monitoraggio pollinico inoltre è uno strumento che può essere usato in maniera indiretta per controllare la flora di un territorio e le sue variazioni nel tempo (Travaglini *et al.*, 2002c).

Un'altra applicazione del monitoraggio pollinico è quella di costituire un metodo che permette di tenere sotto controllo zone limitate nello spazio ma molto frequentate, come le aree archeologiche o siti di monumenti. Il monitoraggio pollinico consente di verificare la presenza di polline allergenico, stabilire una strategia per eliminare le piante che ne sono la causa e verificare che al termine del trattamento la zona sia "bonificata" da tale tipo di polline (Travaglini e Mazzitelli, 2003).

Nell'atmosfera italiana si possono identificare oltre 80 tipi di polline appartenenti a 50 famiglie. Alcuni sono presenti in quantità veramente elevata, come quelli prodotti dalle piante appartenenti alle famiglie delle Cupressaceae e Fagaceae, altri si trovano in quantità molto bassa come quelli prodotti dal sambuco o da Rosaceae da frutto (Frenguelli, 1998). In Italia, come in tutto il bacino del Mediterraneo, la vegetazione è dominata da alberi sempreverdi, arbusti, cespugli ed erbe perenni rizomatose, piante che sono adattate per sopravvivere ad estati lunghe, calde e siccitose. Ne consegue che i tipi pollinici più diffusi in atmosfera sono quelli liberati da alberi appartenenti a Cupressaceae, Fagaceae, Oleaceae e Pinaceae, e da erbacee quelli Gramineae e Urticaceae. Nondimeno l'Italia presenta situazioni climatiche diverse, con vegetazione di tipo centro-europeo, ricche di specie

non termofile quali Corylaceae, Betulaceae, Salicaceae, Asteraceae e altre. Per completare il quadro già molto ricco di essenze vanno considerate le specie introdotte e diffuse sul territorio italiano per i più svariati scopi, da quello ornamentale al rimboschimento e al miglioramento della produzione agricola. Non mancano infine specie introdotte accidentalmente perché importate come infestanti di sementi, o diffuse in seguito all'abbandono di terreni o a lavori di sbancamento (Frenguelli, 1998). Tra le specie allergeniche introdotte in Italia accidentalmente figura *Ambrosia artemisifolia* L. nativa del nord America dove è tra le principali cause di allergie respiratorie. E' stata introdotta in Italia con l'importazione di sementi e mangimi per animali (Juhasz, 1998), ed essendo particolarmente resistente e poco esigente dal punto di vista ecologico si sta diffondendo rapidamente lungo la penisola, e ogni anno si registrano concentrazioni crescenti di polline da lei prodotto e delle allergie respiratorie da esso causate (Corsico *et al.*, 2000).

L'aerosol atmosferico è costituito da particelle di varia dimensione e di origine organica o inorganica. Le particelle organiche costituiscono il particolato biologico aerodisperso, detto aerospora, che risulta formato da granuli di polline, spore di funghi, di briofite e di pteridofite, propaguli di licheni, alghe, frammenti di vegetali e insetti, virus, batteri, protozoi ecc.

Non sono solamente le condizioni geografiche e la vegetazione a determinare la composizione dell'aerospora, ma anche i fattori meteorologici che incidono sia sulla fase riproduttiva delle piante determinando il momento dell'inizio e della fine delle fioriture, sia sulla permanenza del polline in atmosfera (Brunetti *et al.*, 2004). I fattori più importanti che determinano l'uscita dalla fase di dormienza invernale e l'inizio della fase riproduttiva sono l'allungamento del fotoperiodo e l'aumento della temperatura a seguito di un accumulo di freddo chiamato "winter chilling" che le piante hanno subito durante l'inverno (Frenguelli *et al.*, 1991b; Frenguelli *et al.*, 1992).

La direzione e l'intensità del vento influenzano la composizione dell'aerospora in quanto determinano spostamenti di masse d'aria che trasportano granuli pollinici anche da distanze notevoli (Iwanami *et al.*, 1988).

Accanto al monitoraggio pollinico, quindi, è necessaria una registrazione delle variabili meteorologiche che incidono sul rilascio e la dispersione del polline, e uno studio della flora del territorio e delle sue variazioni nel tempo (Travaglini *et al.*, 2000).

Il campionario pollinico situato sul tetto del Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma "Tor Vergata" è attivo tutto l'anno e, grazie all'analisi e riconoscimento del polline campionato, ha fornito dati sull'andamento della pollinazione delle piante anemofile, sulla concentrazione totale annua di polline prodotta dalle singole famiglie o dai singoli generi di piante, sul periodo di fioritura e la permanenza del polline nell'aria.

Da tali dati è emerso che una delle famiglie di piante maggiori produttrici di polline era quella delle Fagaceae, responsabile annualmente di una produzione di polline compresa tra il 15 e il 19% del totale campionato (Figura 3).

Per il solo genere *Quercus* si registrano concentrazioni di polline annue (registrate in aprile e maggio) confrontabili con quelle prodotte dall'intera famiglia delle Gramineae, alla quale appartengono numerosissimi generi e specie di piante spontanee che fioriscono sequenzialmente da fine marzo ad agosto inoltrato (Travaglini *et al.*, 2002a).

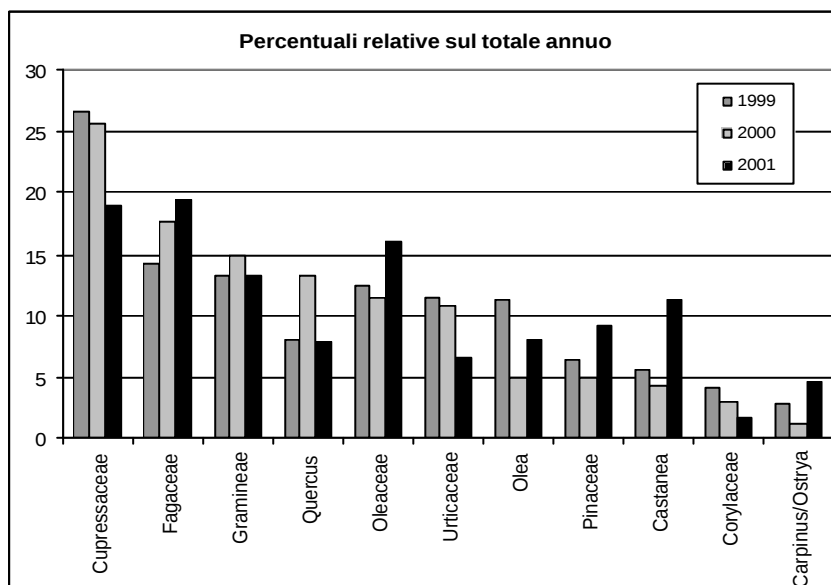


Fig. 3: percentuale relativa rispetto al totale annuo delle concentrazioni di polline registrate presso il Centro di monitoraggio di Roma Tor Vergata per le principali famiglie e i generi di piante allergeniche.

Data l'abbondante presenza di polline di Fagaceae nell'aria nella zona dell'Università di Tor Vergata, è stata effettuata un'indagine epidemiologica per valutare la presenza di soggetti ad esso sensibili.

Presso la Cattedra di Botanica dell'Università di Tor Vergata, in collaborazione con la Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica dello stesso Ateneo, nei mesi di aprile-maggio degli anni 1999 - 2002 è stato condotto, tramite la distribuzione di un questionario, un monitoraggio delle allergie e della loro prevalenza nell'area di Tor Vergata.

Nei quattro anni del sondaggio il questionario è stato distribuito al personale docente, tecnico e amministrativo e agli studenti di tutte le Facoltà dell'Università di Roma "Tor Vergata".

I dati del questionario mostravano che il 4% dei soggetti allergici riferiva di essere sensibile al polline di Fagaceae (Grilli Caiola *et al.*, 2002).

Dopo il primo anno di sondaggio un gruppo di soggetti che aveva dato il proprio consenso informato è stato contattato dalla Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica di Tor Vergata e sono stati sottoposti ad anamnesi completa, prove allergologiche cutanee ("Prick Test") e, nei casi dubbi, dosaggio delle IgE specifiche, per stimare la validità dei dati ottenuti dall'analisi dei questionari.

Il "Prick Test", o test dermatologico cutaneo, comporta la penetrazione attraverso la cute, mediante una piccola lesione superficiale, di una quantità di allergene adeguata a provocare una risposta specifica misurabile. La risposta ad un allergene è giudicata positiva quando il pomfo relativo ha un diametro di almeno 3 mm (pari ad una area di 7 mm²). Qualora più di un allergene risultasse positivo, la dimensione relativa del pomfo ottenuto con ciascun allergene testato è correlabile ad una diversa importanza della sensibilizzazione all'allergene in causa.

Le analisi cliniche hanno confermato la diagnosi di allergia in almeno il 70% dei soggetti che si erano dichiarato allergici.

I risultati dei "Prick Test" mostravano che il 19% dei soggetti allergici era sensibile al polline di Fagaceae, sebbene nessun individuo risultasse monosensibile (De Sanctis *et al.*, 2003).

Pollinosi da Fagaceae

La famiglia delle Fagaceae appartiene alla classe delle Magnoliopsida (Dicotiledoni), sottoclasse Hamamelididae e all'ordine delle Fagales, ordine estremamente importante di piante arboree, che comprende alcune tra le principali specie forestali d'Europa. Le foglie delle Fagales sono semplici, i fiori dotati di perianzio molto ridotto. Le principali famiglie appartenenti a questo ordine sono le Fagaceae, le Betulaceae e le Corylaceae.

Nella famiglia delle Fagaceae i fiori femminili sono riuniti in cime di pochi fiori circondate da poche brattee, l'ovario è infero e costituito da tre carpelli, gli ovuli presentano due tegumenti (Gerola *et al.*, 1995).

In Italia la famiglia annovera tre generi: *Castanea*, *Fagus* e *Quercus*.

Il genere *Castanea*, considerato il più primitivo in quanto presenta fiori femminili e maschili sullo stesso amento lungo ed eretto (i femminili prossimali, riuniti in cime di tre, i maschili distali – Figura 4), e impollinazione ancora parzialmente entomofila. Dall'ovario tricarpace si sviluppano tre acheni monospermi che rimangono avvolti dalle brattee dell'infiorescenza le quali formano una cupola completamente chiusa coperta di aculei pungenti, detta riccio. Al genere appartiene il castagno (*Castanea sativa* Mill.), probabilmente originario dell'Europa orientale e dell'Asia minore, introdotto in Italia in epoca pre-romana e ormai naturalizzato tanto da essere considerato pianta indigena.



Fig 4: Fiori maschili di *Castanea sativa* Mill.

Il genere *Fagus* con la specie *Fagus sylvatica* L., ha fiori femminili ridotti a due in ogni cima e separati dai maschili (Figura 5) che sono riuniti in amenti pendenti lungamente pedunculati. L'impollinazione è esclusivamente anemofila. Il frutto (faggiola) è costituito da due acheni completamente chiusi in una cupola legnosa formata da quattro valve, coperte di brevi aculei non pungenti.

Il faggio è uno degli alberi forestali di maggior importanza in Italia, sulle Alpi ma soprattutto sugli Appennini dove si spinge fino al limite della vegetazione arborea.



Fig 5: Fiori maschili di *Fagus sylvatica* L.

Il genere *Quercus* rappresenta uno dei più vasti e diversi generi di piante arboree; sono state descritte 371 specie di querce diffuse in tutto l'emisfero boreale, la maggior parte delle quali si trova in America centrale e negli Stati Uniti. Anche in Europa le querce sono largamente diffuse e costituiscono la principale componente della vegetazione di bassa collina e pianura (Pignatti, 1985).

Le querce hanno fiori femminili solitari, ciascuno avvolto dalle brattee dell'infiorescenza, che a maturità avvolgono la parte basale del frutto, la ghianda, a formare una cupola, i fiori maschili in amenti penduli (Figura 6) ad impollinazione esclusivamente anemofila.

Una prima distinzione tra le varie specie di querce è fatta sulla base delle foglie, che possono essere persistenti (nel leccio, *Q. ilex* L., nella sughera, *Q.*

suber L., e nella quercia spinosa, *Q. coccifera* L.), o decidue. Tra le specie a foglie decidue la classificazione si basa sulla lobatura delle foglie, sull'estensione della cupola che ricopre parzialmente il frutto (ghianda), sulla presenza o assenza di peduncolo nelle foglie e nelle ghiande, sulla pubescenza dei rametti e delle foglie giovani. (Pignatti, 1985).



Fig 6: Fiori maschili di *Quercus ilex* L.

Nell'ambito del genere *Quercus* alcuni studi sono stati fatti per determinare il numero di amenti per pianta, il numero di fiori per amento, e il numero di granuli pollinici emesso da ciascun fiore. Tra i generi di quercia studiati, il leccio è uno dei maggiori produttori di polline (Gomez-Casero *et al.*, 2004).

Il **leccio** è ampiamente diffuso nella città di Roma, come pianta spontanea importante componente della vegetazione della Macchia Mediterranea, e usato come pianta ornamentale in parchi e giardini (Celesti-Grapow, 1995), costituendo, secondo un censimento floristico del 1998, circa il 5% delle essenze arboree di Roma (Attorre *et al.*, 1999). Il leccio è molto diffuso anche nei dintorni della città, soprattutto sui colli albani, dove è usato come componente importante nei giardini delle ville storiche (Travaglini *et al.*, 1991).

La famiglia delle Fagaceae, assieme a quelle delle Betulaceae e delle Corylaceae, appartiene all'ordine delle Fagales.

A tale ordine di piante appartengono specie con polline di nota rilevanza allergenica, quali la betulla, l'ontano, il nocciolo, i carpini.

In particolare il polline di betulla è stato ampiamente studiato in quanto responsabile di circa il 20% delle sensibilizzazioni da polline in nord Europa, ed è noto che i pazienti allergici al polline di piante arboree presentano una prima sensibilizzazione al polline di betulla, e reagiscono in maniera più lieve al polline delle altre Fagales. Inoltre caratterizzando le proteine allergeniche del polline di betulla è stato identificato un allergene maggiore, Bet v 1, che contiene la maggior parte degli epitopi di legame alle IgE presenti nei pollini delle altre specie di piante appartenenti all'ordine delle Fagales (Eriksson *et al.*, 1984).

La caratterizzazione immunochimica e molecolare dell'allergene maggiore del polline di betulla ha portato alla identificazione degli epitopi di legame alle IgE, che sono comuni a molte proteine allergeniche presenti in polline di piante arboree e in cibi derivati da piante (Niederberg *et al.*, 1998).

La cross reattività sviluppata dai soggetti allergici a più di un tipo pollinico di specie arboree distinte può essere la conseguenza della presenza di epitopi di legame alle IgE uguali o simili in allergeni di pollini diversi (Ipsen e Loewenstein, 1983). Il sequenziamento delle proteine allergeniche estratte dal polline delle piante appartenenti all'ordine delle Fagales ha dimostrato una profonda similarità di sequenza tra esse. Si tratta di proteine appartenenti alla famiglia delle "Pathogenesis related protein (PR-protein)". A questo gruppo di proteine appartengono gli allergeni maggiori della betulla (Bet v 1), dell'ontano (Aln g 1), del nocciolo (Cor a 1), del carpino bianco (Car b 1) (Ipsen e Hansen, 1991).

Si tratta di proteine di basso peso molecolare (circa 17 kDa), stabili in condizioni acide di pH e resistenti alla degradazione da proteasi. Hanno sequenza molto conservata e presentano struttura simile, costituita da 7 foglietti β antiparalleli e 3 α eliche, di cui quella all'estremità N terminale della molecola costituisce l'epitopo di legame alle IgE (Spangfort *et al.*, 1999). La sintesi di alcune proteine PR non è indotta da attacchi patogeni o da condizioni di stress, ma esse risultano espresse costitutivamente in alcuni tessuti delle piante; tali proteine sono indicate come "PR-like" (Hoffmann-Sommergruber, 2000).

Le conoscenze dell'attività allergenica del polline delle Fagaceae sono scarse. E' noto, identificato e caratterizzato l'allergene maggiore del polline di castagno (*Castanea sativa* Mill.), chiamato Cas s 1. Si tratta di una proteina dal peso molecolare di 22 kDa (Kos *et al.*, 1993), con sequenza nota e ascritta per similarità di sequenza alla famiglia di proteine PR nonostante il suo peso molecolare risulti maggiore rispetto agli altri allergeni identificati per questo gruppo di piante (Hirschwehr *et al.*, 1993). Alla stessa famiglia di

proteine è ascrivito l'unico allergene pollinico caratterizzato per il genere *Quercus*, l'allergene maggiore della quercia bianca (*Quercus alba* L.), chiamato Que a 1. Si tratta di una proteina dal peso molecolare di 17 kDa (Loria *et al.*, 1989), con sequenza simile alle proteine PR (Ipsen e Hansen, 1991). La quercia bianca non è spontanea in Italia, sebbene sia usata in forma coltivata come specie ornamentale in parchi e giardini (Pignatti, 1985).

Alcuni studi sono stati effettuati per stabilire la presenza di sensibilizzazioni da polline di Fagaceae.

In uno studio condotto a Firenze (Arrigoni *et al.*, 1995) è stato valutato che il polline di Fagaceae è responsabile del 3,6% delle pollinosi, e che non produce monosensibilizzazioni.

Riguardo al polline di castagno, il solo dato presente in letteratura è riferito ad un campione di soggetti allergici di Parigi, e indica la prevalenza di sensibilizzazioni da tale polline nel 23% dei soggetti allergici, e nessun monosensibilizzabile (Laurent *et al.*, 1993).

Per quanto riguarda il genere *Quercus*, invece, la prevalenza di positività al "Prick Test" effettuato con l'estratto di polline di *Q. rotundifolia* Lam (= *Quercus ilex* L.) è 14% su un campione di allergici a Madrid (Subiza *et al.*, 1995), mentre per si parla di prevalenza di positività del 35% di allergici e nessuna monosensibilizzazione a Mérida (sud ovest della Spagna) (Prados *et al.*, 1995) e del 6-8% di allergici a Montpellier (sud della Francia) e nessuna monosensibilizzazione (Bousquet *et al.*, 1984). Per l'Italia e in particolare per la città di Roma l'unico dato presente in letteratura indica il 5,7% di positività al polline di quercia (Luscri *et al.*, 1996).

In letteratura c'è accordo nell'ipotizzare che le proteine allergeniche del polline potrebbero essere coinvolte nei processi di interazione tra polline e stimma, nei meccanismi di riconoscimento specie-specifico, degradazione della parete dello stimma, produzione e allungamento del tubetto pollinico. Molti studi sono stati condotti per individuare in modo preciso la funzione biologica delle proteine allergeniche. Una prima indicazione può derivare dall'osservazione della localizzazione ultrastrutturale di tale proteine: molecole localizzate sulla parete esterna del granulo pollinico, sull'esina o sull'intina, quindi molto esposte verso l'ambiente esterno, potrebbero essere coinvolte nelle prime fasi della impollinazione, come l'interazione con lo stimma e i meccanismi di compatibilità/incompatibilità. Proteine che invece sono localizzate all'interno del granulo pollinico, nel citoplasma, sul reticolo endoplasmatico o in altri compartimenti interni, potrebbero essere coinvolte in fasi più tardive della fecondazione (Grote, 1999).

Scopo del lavoro

Per essere considerato allergenico un polline deve possedere alcune caratteristiche:

1. Deve contenere una componente antigenica in grado di indurre una risposta anticorpale IgE- mediata da parte del sistema immunitario.
2. Deve appartenere a una pianta anemofila e di conseguenza essere prodotto in grandi quantità
3. Deve essere sufficientemente piccolo e leggero per essere trasportato anche a grande distanza dal vento
4. Deve appartenere a una specie ad ampia diffusione sul territorio.

Il polline delle Fagaceae in generale e del leccio in particolare, pur possedendo le caratteristiche 2, 3 e 4, non è ancora classificato come allergenico in quanto non ha ricevuto finora la dovuta attenzione sperimentale.

Perciò nella presente ricerca si intendono verificare i dati aerobiologici, fenologici, clinici, biochimici, immunologici e ultrastrutturali che portano a considerare il leccio come pianta allergenica mediante determinazione degli allergeni del polline e loro localizzazione nel granulo pollinico.

Ai fini della ricerca si intende procedere secondo le seguenti tappe:

- Proseguire il monitoraggio del polline di Fagaceae nell'atmosfera di Tor Vergata.
- Identificare soggetti che presentano risposta immunologica al test con estratto di polline di Fagaceae.
- Determinare la presenza di molecole allergeniche in polline di *Quercus ilex*.
- Saggiare l'attività di tali proteine con il siero di soggetti sensibili al polline di Fagaceae.
- Saggiare la cross-reattività degli allergeni di *Q. ilex* con quelli di altre specie di *Quercus* e di altre Fagaceae.
- Localizzare a livello subcellulare la presenza e la distribuzione degli allergeni nel polline di *Q. ilex* e, per confronto, nel polline di altre specie di Fagaceae
- Determinare la cross-reattività tra il polline di leccio e quello di altre Fagaceae e di altre piante filogeneticamente distanti.

La ricerca è stata svolta presso la Cattedra di Botanica, dove esiste un Centro di Monitoraggio pollinico e una stazione di rilevamento meteorologico, dalle quali attingere i dati riguardanti la presenza di polline aerodiffuso nell'area dell'Università di Roma Tor Vergata, in collaborazione con la Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica dello stesso Ateneo. Le tecniche biochimiche e immunologiche sono state apprese presso il Dipartimento di Immunologia dell'Istituto Superiore di Sanità, il sequenziamento è stato effettuato in collaborazione con l'Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, la preparazione del polline per l'osservazione al microscopio elettronico è stata effettuata in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Ambientale dell'Università di Siena.

Materiali e Metodi

Monitoraggio pollinico a Tor Vergata

Per la cattura del polline è stato utilizzato il campionatore volumetrico Hirst (1952), costituito da una pompa a vuoto che aspira un volume noto d'aria (10 litri al minuto, corrispondenti alla quantità d'aria inalata da un individuo in condizioni di riposo), e la convoglia, tramite una feritoia di dimensioni 14 x 2 mm, su un rullo che viene fatto ruotare da un sistema a orologeria. Sul rullo viene fatto aderire un nastro di melinex trasparente, su cui viene spalmata una soluzione a base di silicone. Il rullo gira ad una velocità di 2 mm l'ora, ed è tarato in modo tale da compiere un intero giro alla settimana. Sul nastro restano intrappolate le particelle solide aerodisperse, tra cui il polline. Settimanalmente il nastro di melinex viene sostituito, e il nastro della settimana precedente portato in laboratorio e tagliato in segmenti relativi ai giorni della settimana (ciascun segmento misura 48 mm). I vari segmenti di nastro vengono montati su vetrini portaoggetto, colorati con gelatina contenente fucsina, che ha la proprietà di legarsi selettivamente ai granuli di polline, colorandone i rivestimenti esterni (esina) di rosa, e quindi evidenziarli per l'osservazione al microscopio ottico (Mandrioli, 1994).

Al microscopio ottico, con un ingrandimento di 400X, i granuli di polline vengono identificati, conteggiati e classificati in famiglie o generi di piante che li hanno prodotti. I risultati della lettura dei vetrini sono riportati su una scheda compilata settimanalmente, e inviati alla Associazione Italiana di Aerobiologia (A.I.A.), che si occupa della diffusione delle informazioni a livello nazionale.

Settimanalmente viene inoltre aggiornata una pagina del sito dell'Università di Roma "Tor Vergata" (www.uniroma2.it/biologia/polline) che riporta le principali famiglie di piante di interesse allergenico con le concentrazioni di polline presenti nell'aria nella settimana precedente e un'indicazione previsionale sulla settimana seguente.

Prelievo del sangue e separazione del siero

Nei quattro anni del monitoraggio delle allergie (1999 – 2002) il questionario è stato distribuito al personale docente, tecnico e amministrativo e agli studenti di tutte le Facoltà dell'Università di Roma "Tor Vergata".

Il questionario era composto da due parti: nella prima parte si chiedevano informazioni personali, quali età, sesso, occupazione, tempo di permanenza all'Università, distanza dell'abitazione dall'Università, attitudine al fumo, presenza di familiari allergici ecc. Nella seconda parte si poteva mettere in relazione la presenza di manifestazioni allergiche con la stagione di insorgenza, le indagini effettuate per stabilire una diagnosi e gli allergeni responsabili delle allergie.

Nel 2002 sono stati statisticamente elaborati i dati ottenuti dai questionari compilati mediante il programma di statistica SPSS.

I soggetti che dopo il primo anno di sondaggio erano stati sottoposti ad analisi cliniche, ed erano stati dichiarati sensibili al polline delle Fagaceae, sono stati contattati per ottenere dei campioni di sangue da far reagire con l'estratto proteico del polline di Fagaceae.

Cinque di loro hanno accettato di partecipare alla ricerca e hanno donato un campione di sangue. I pazienti volontari sono stati chiamati con le lettere A, B, C, D ed E.

Il prelievo di sangue è stato effettuato ai pazienti A, B, C e D nel giugno 2002 presso il "Policlinico Tor Vergata" dai medici afferenti alla Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica. Poiché il siero prelevato non è stato sufficiente per condurre tutti gli esperimenti, un secondo prelievo è stato effettuato nel dicembre 2002 ai pazienti A, B e D, ai quali si è aggiunto il paziente E. Il paziente C non si è reso nuovamente disponibile per un secondo prelievo, quindi in alcuni esperimenti il suo siero non è stato saggiato.

Il sangue prelevato dai soggetti allergici è stato conservato a temperatura ambiente per 8 ore e a 4°C overnight. Il siero è stato separato dalla parte cellulare del sangue mediante centrifugazione a 3000 rpm per 15 minuti. Il siero è stato aliquotato e conservato a -20°C fino all'uso.

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati dei "Prick Test" effettuati ai soggetti volontari. I cinque soggetti sono tutti polisensibili, reattivi verso il polline di piante erbacee e arboree, e con reattività diverse nei confronti del polline di Fagaceae.

	A	B	C	D	E
Gramineae	****	*****	****	*****	**
<i>Artemisia</i>	**	**	**	*	neg
<i>Ambrosia</i>	neg	**	**	neg	neg
<i>Chenopodium</i>	neg	neg	***	*	neg
<i>Plantago</i>	**	**	**	**	neg
<i>Parietaria</i>	*****	neg	***	***	*****
Cupressaceae	neg	neg	neg	*	**
Fagaceae	***	***	***	**	***
<i>Platanus</i>	****	***	****	**	**
<i>Betula</i>	***	*****	**	*	**
<i>Corylus</i>	***	***	***	*	*
<i>Tilia</i>	***	neg	**	**	neg
<i>Olea</i>	***	**	***	*	neg

Tab 1: Risultati delle prove allergologiche cutanee sui 5 soggetti che hanno donato un campione di sangue per la ricerca. Neg = negativo. Gli asterischi si riferiscono all'intensità della reazione sviluppata durante il Prick Test.

Purificazione delle IgE dal siero mediante cromatografia s/l su proteina G

I sieri dei pazienti A, B, C e D sono stati processati per la purificazione della frazione di IgE in accordo con il metodo descritto in Iacovacci *et al.*, (2001). Il siero del paziente E non è stato utilizzato perchè non era ancora disponibile nel momento della purificazione.

1,25 ml di proteina G in resina sono stati posti in tubi da centrifuga e lavati due volte con acqua distillata e due volte con tampone fosfato 20 mM pH 7. La resina di proteina G è poi stata sciolta in tampone fosfato e caricata sulla colonnina. Il tampone fosfato è stato fatto eluire dalla colonnina mediante una pompa peristaltica che permette di variare il flusso da 0,3 ml/min a 0,16 ml/min: l'effetto ottenuto è l'impaccamento della resina nella colonnina. Senza mandare a secco la resina è stato caricato nella colonnina 1,5 ml di siero, che attraversando la colonnina è stato purificato dalla frazione delle IgG che sono trattenute, mentre la restante parte di immunoglobuline (IgE, IgA e IgM) sono effluite liberamente e raccolte in provette. La resina è stata lavata con tampone fosfato per far effluire completamente le immunoglobuline non legate e l'effluente è stato raccolto

in altre provette. La colonna è stata poi lavata più volte in tampone fosfato. L'eluizione delle IgG avviene mediante aggiunta alla colonnina di HCl/glicina 0,2M pH 2,5. L'eluato è stato raccolto in provette. La colonnina è stata quindi lavata più volte con tampone fosfato e poi con acqua distillata, e conservata in etanolo 20% + 0,2% NaN₃ a 4°C, e può essere riutilizzata. Le frazioni di IgG ottenute sono state portate a pH 7 mediante l'aggiunta di Tris/HCl 1,5 M pH 8,8, e conservate a 4°C dopo l'aggiunta di NaN₃ 0,01%. Le frazioni di IgE ottenute sono state conservate a 4°C dopo l'aggiunta di NaN₃ 0,01%.

Le frazioni di IgE ottenute sono state dosate mediante saggi ELISA per la loro reattività con l'estratto proteico del polline di leccio.

Raccolta del polline di leccio ed estrazione delle proteine

Negli anni 2002 – 2004, infiorescenze mature di *Quercus ilex* L. sono state raccolte da piante di sicura identificazione coltivate nelle aree verdi del Campus Universitario di Tor Vergata e nella villa comunale di Albano Laziale. Le infiorescenze sono state conservate in buste di carta e portate in laboratorio. Il polline fuoriuscito dalle antere è stato raccolto in eppendorf e conservato a -80°C fino all'uso.

Per l'estrazione proteica è stato seguito il protocollo di Jarolim *et al.* (1989). Il polline è stato sospeso in bicarbonato d'ammonio 125 mM, NaN₃ 15 mM 1:10 (w/v), con l'aggiunta di PMSF quale inibitore delle proteasi. L'estrazione è avvenuta in agitazione per 20 ore a 4°C. Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente il supernatante è stato recuperato.

Nei primi esperimenti il campione è stato dializzato contro bicarbonato d'ammonio 5 mM (1,5 h per 3 volte), quindi recuperato. Il "cut-off" della membrana da dialisi era di 3500 Da.

E' stata valutata la quantità di proteine presenti nel campione (dializzato o no) secondo il protocollo di Bradford (1976). Aliquote del campione sono state poi liofilizzate e conservate a -20°C fino all'uso.

Estrazione delle proteine dalle foglie del leccio

Per l'estrazione delle proteine dalle foglie del leccio è stato seguito il protocollo descritto in Wang *et al.*, (2003), che prevede una prima fase necessaria per eliminare i contaminanti (pigmenti, lipidi), e una seconda fase di estrazione con fenolo in presenza di SDS.

Foglie di piante di leccio coltivate nelle aree verdi del Campus Universitario di Tor Vergata sono state raccolte, pulite e ridotte in polvere in un mortaio con l'aggiunta di azoto liquido.

0,2 g di foglie ridotte in polvere sono state trasferite in tubi da centrifuga e sospesi in 1 ml di acetone freddo, vortexati per 30 secondi e centrifugati a 10000 rpm per 3 min a 4°C. Il supernatante è stato eliminato e il pellet è stato lavato nuovamente nello stesso modo. Eliminato anche il secondo supernatante, il pellet è stato trasferito in un mortaio pulito e lasciato asciugare a temperatura ambiente per circa 20 minuti. Il pellet è stato poi trasferito in tubi da centrifuga puliti e lavato con TCA 10% in acetone per 3-4 volte, finché il supernatante è risultato limpido. Dopo ogni lavaggio il campione è stato vortexato per 30 secondi e centrifugato come sopra. Sono seguiti due lavaggi in TCA 10% in acqua e due lavaggi in acetone freddo 80%. Il pellet è stato fatto asciugare nuovamente all'aria e conservato a -80°C fino all'estrazione proteica.

0,1 g di polvere di foglie di leccio preparata precedentemente sono stati risospesi in 0,8 ml di fenolo equilibrato con Tris pH 8,0 più 0,8 ml di tampone SDS (30% saccarosio, 2% SDS, 0,1M Tris HCl pH 8,0, 0,5% 2-β-mercaptoetanolo). Il campione è stato vortexato per 30 secondi e centrifugato a 10000 rpm per 3 min a 4°C.

La fase superiore (fenolica) è stata delicatamente pipettata in provette pulite facendo attenzione a non rompere l'interfase di SDS. Alla fase fenolica sono stati aggiunti 5 volumi di 0,1M acetato d'ammonio in metanolo freddo, e il composto è stato messo a -20°C per 30 minuti.

Le proteine sono state recuperate centrifugando a 10000 rpm per 5 min ed eliminando il supernatante. Il precipitato proteico è stato lavato ulteriormente con 0,1 M acetato d'ammonio in metanolo freddo e con acetone freddo 80%. L'estratto è stato fatto poi asciugare e risospeso in acqua distillata per il dosaggio delle proteine o nel tampone di corsa (Laemmli, 1970) per l'elettroforesi.

Identificazione immunologica degli allergeni: SDS-PAGE, Western Blotting e ELISA

L'estratto proteico liofilizzato è stato risospeso in acqua distillata, denaturato nel tampone di corsa (Laemmli, 1970) mediante bollitura per 10 min, e caricato su gel di poliacrilammide 15% (minigel bio rad) (Laemmli, 1970), alle seguenti condizioni di corsa: 70V per 10 min, 200V per 1h o fino a che il fronte raggiungeva la fine della corsa, oppure su gel di tricina (Schagger e Von Jagow, 1987), alle seguenti condizioni di corsa: 70V per 30 min, 100V per 2h o fino a che il fronte raggiungeva la fine della corsa.

Al termine della corsa il gel è stato recuperato e le proteine separate sono state colorate con Comassie o trasferite su membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento è avvenuto a 260 mA costanti per 2 ore, a 4°C.

Le strisce di nitrocellulosa sono state lavate con PBS tween 0,05% in agitazione (3 lavaggi da 10 min), preincubate con BSA 5% in PBS per 1h in agitazione, lavate con PBS tween 0,05% (5 lavaggi da 15 min), incubate con anticorpo primario (siero di soggetto allergico diluito 1:20 in PBS tween 0,05%), in agitazione a 4°C overnight. Dopo aver lasciato le strisce di nitrocellulosa per 20 min a temperatura ambiente in agitazione, queste sono state lavate con PBS tween 0,05% (5 lavaggi da 15 min), e incubate con anticorpo secondario (rabbit anti human IgE coniugato con perossidasi, diluito 1:5000 in PBS tween 0,05%), per 1h in agitazione a temperatura ambiente. Le strisce sono poi state lavate con PBS tween 0,05% (5 lavaggi da 15 min) e la perossidasi è stata rilevata con DAB-H₂O₂ fino allo sviluppo del colore. La reazione è stata bloccata con acqua distillata.

In un primo esperimento, dopo il trasferimento su membrana di nitrocellulosa e la marcatura con l'anticorpo primario (sieri), le strisce di nitrocellulosa sono state lavate e incubate con anticorpo secondario rabbit anti human IgE radiomarcato, coniugato con I₁₂₅. Dopo aver dosato il radiomarcato è stata valutata la quantità da utilizzare corrispondente a 30000 CPM (conte per minuto) per ciascuna striscia di nitrocellulosa. I campioni così incubati sono stati mantenuti in agitazione lenta overnight.

Sono seguiti lavaggi in PBS tween 0,05% (5 lavaggi da 15 min, seguiti da un lavaggio in acqua distillata), quindi le strisce sono state esposte su lastra fotografica a -80°C per 72 ore.

La reattività delle IgE presenti nel siero dei soggetti allergici verso le proteine estratte dal polline di leccio è stata verificata tramite saggi ELISA secondo il protocollo descritto in Di Felice *et al.* (1994).

In piastre da 96 pozzetti è stato fatto adsorbire l'antigene (estratto proteico del polline di leccio) nella concentrazione di 20 µg/ml di antigene per pozzetto, mediante incubazione in camera umida a 37°C per 3 ore e poi a 4°C overnight. I pozzetti sono stati lavati con PBS tween 0,05% (4 lavaggi da 5 min), pre-incubati con PBS tween 0,1% per 1,5h in camera umida a temperatura ambiente, lavati con PBS tween 0,05% (4 lavaggi da 5 min), incubati con l'anticorpo primario (sieri dei soggetti allergici diluiti 1:5 in BSA 1% in PBS tween 0,05%, per 3h in camera umida a temperatura ambiente. I pozzetti sono quindi stati lavati con PBS tween 0,05% (4 lavaggi da 5 min) e incubati con anticorpo secondario, (rabbit anti human IgE coniugato con perossidasi, diluito 1:5000 in BSA 1% in PBS tween 0,05%), in camera umida a temperatura ambiente e al buio. Dopo 4 lavaggi da 5 min con PBS tween 0,05% nei pozzetti è stato aggiunto il substrato per rilevare la perossidasi, costituito da OPD (ortofenilendiammina 0,5mg/ml – H₂O₂ 1%), per 15 min. Dopo che la colorazione si era sviluppata la reazione è stata bloccata con H₂SO₄ 12% e la densità ottica misurata con spettrofotometro alla $\lambda = 495$ nm.

ELISA con deglicosilazione

Per determinare se il legame delle IgE dei soggetti allergici avvenga con epitopi glucidici o proteici degli allergeni del polline di leccio sono stati condotti saggi ELISA con passaggi di deglicosilazione, secondo il protocollo di Woodward *et al.*, (1985) modificato da Afferni *et al.* (1999).

Dopo aver piastrato l'antigene e aver preincubato i pozzetti come nel metodo descritto in Di Felice *et al.* (1994), sono stati effettuati due lavaggi con tampone acetato 0,1M pH 4,4, seguiti da incubazione con periodato 10 mM in tampone acetato in camera umida a temperatura ambiente e al buio (il periodato è sostituito, nei pozzetti di controllo, da tampone acetato). Sono seguiti due lavaggi in tampone acetato e incubazione con boro idruro 50 mM (preparato al momento) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo 4 lavaggi da 5 min in PBS tween 0,05% si è proceduto con l'incubazione con gli anticorpi come nel metodo descritto in Di Felice *et al.* (1994).

Sequenziamento

Per effettuare il sequenziamento della proteina ritenuta allergenica, l'estratto proteico di polline di leccio è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di tricina, come descritto, e poi trasferito su membrana di PVDF (polyvinylidene fluoride) che risulta inerte ai solventi e reagenti della chimica di Edman.

La membrana è attivata in metanolo 100% per 10 min e poi nel tampone di trasferimento (tampone CAPS – MeOH 10%) per 10 min. (tampone CAPS – acido 3-cicloexilamino 1-propanesulfonico 100mM, pH 11).

Il trasferimento è avvenuto a 200 mA costanti per 2 ore, a 4°C.

A trasferimento avvenuto, la membrana è stata lavata con acqua bidistillata e con MeOH 100% per qualche secondo, poi è stata colorata con coomassie-blue 0.1% in MeOH 40% acido acetico 1% per 3 min.

L'eccesso di colorante è stato eliminato con MeOH 40% per 40 min. La membrana è stata poi sciacquata in acqua bidistillata, asciugata e conservata a -20°C fino al sequenziamento.

La quantità minima di proteina per effettuare il sequenziamento è paria a 70 picomoli.

Una volta identificata la banda corrispondente alla proteina da sequenziare, la membrana è stata ritagliata e lavata ulteriormente per rimuovere l'eccesso di colorante, con 1 ml di CH₃OH 100% (sequencing grade) e 0.1% TEA (triethylamine) e poi con 1 ml di 100% CH₃OH (sequencing grade).

La membrana ancora bagnata è stata poi caricata nel cartridge dello strumento PROCISE Protein Sequencing System dell' Applied Biosystems che effettua la sequenza. L'apparecchio ha effettuato 50 cicli che hanno rivelato le sequenze amminoacidiche lette, utilizzando il programma Pulsed Liquid PVDF Protein per la degradazione di Edman.

Il sequenziamento è stato effettuato presso l'Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico "Agostino Gemelli" di Roma.

Microscopia ottica ed elettronica

Preparazione polline per osservazione al SEM

Polline prelevato da antere mature è stato processato come descritto in Leonardi *et al.* (2001): il polline è stato fissato in glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato 0,1M, pH 7 overnight a 4°C. Dopo tre lavaggi in tampone fosfato 0,1M il polline è stato postfissato in tetrossido d'osmio 1% per 2 ore a temperatura ambiente. Sono seguiti tre lavaggi in tampone fosfato 0,1M e la disidratazione del campione in soluzioni di etanolo via via più concentrate, da 50% a 100%. Il campione così trattato è stato sottoposto a critical point dryer per far sublimare l'acqua residua, montato su stub, ricoperto d'oro tramite sputter e osservato al SEM Zeiss DSM 950 a 5 kV.

Preparazione polline per osservazione al TEM

a) Preparazione convenzionale:

Il polline prelevato da antere mature è stato idratato in camera umida per 1 ora, quindi trattato con tampone cacodilato 0,066M pH 7.2 per 5 minuti, poi fissato in glutaraldeide 3% in tampone cacodilato per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi in tampone cacodilato il campione è stato post fissato in tetrossido d'osmio 1% per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi in tampone e in acqua distillata il campione è stato disidratato in soluzioni di etanolo via via più concentrate, da 50% a 100%. Il campione è poi stato incluso in resina ERL ("Epoxy Resin Low viscosity", resina epossidica a bassa viscosità) (Spurr, 1969) mediante passaggi in miscele etanolo/resina 3:1, 1:1, 1:3 e in resina assoluto. La polimerizzazione è avvenuta a 70°C per 8 ore.

b) Freeze-substitution:

In collaborazione col Dipartimento di Biologia Ambientale dell'Università di Siena sono stati condotti gli esperimenti di freeze-substitution, secondo il metodo di fissazione descritto in Lancelle *et al.* (1986), e di inclusione in resina acrilica LR-white secondo il metodo descritto in Lancelle e Hepler (1989). Il polline prelevato da antere mature è stato idratato in camera umida per 1 ora e rapidamente congelato in propano

liquido raffreddato da azoto liquido. Il propano liquido è stato poi sostituito con acetone anidro e il campione è stato conservato a -80°C per 48 ore. Dopo un lavaggio in acetone anidro il campione è stato gradualmente portato alla temperatura ambiente, in 8 ore. L'acetone è stato sostituito con etanolo assoluto e il campione è stato incluso in resina LR-white. La polimerizzazione è avvenuta mediante esposizione alla luce ultravioletta per 8 ore a 4°C .

Sezioni ultrasottili (90 nm) di polline incluso in resina sono state montate su retini da microscopia elettronica e sottoposte a doppia colorazione: i retini sono stati incubati in Acetato di Uranile 2% al buio per 20 minuti, lavati con acqua bidistillata, incubati con Citrato di Piombo in camera umida per 5 minuti, lavati con acqua bidistillata e asciugati e osservati al microscopio elettronico a trasmissione CEM Zeiss 902 a 80 kV.

Colorazione per polisaccaridi (Thiery)

La colorazione con proteinato d'argento è stata effettuata in accordo al metodo di Thiery (1967). Sezioni ultrasottili di polline sono state montate su retini da microscopia elettronica in oro, e incubate su goccia nelle seguenti soluzioni: acido periodico 1% per 30 min, seguito da lavaggi in acqua distillata, tiosemicarbazide 1% in acido acetico 10% per 3 ore, seguito da lavaggi in soluzioni di acido acetico a concentrazioni decrescenti (da 10% a 1%), proteinato d'argento 1% per 30 minuti al buio, seguito da lavaggi in acqua distillata. I retini sono stati asciugati e osservati al microscopio elettronico a trasmissione CEM Zeiss 902 a 80 kV.

Colorazioni citochimiche al MO

Per evidenziare la presenza di amido, lipidi e proteine all'interno dei granuli pollinici, granuli interi di polline di leccio conservati a -20°C e sezioni semifini (400-600 nm) di polline di leccio fissato in glutaraldeide in tampone cacodilato e incluso in resina epossidica (Spurr) sono state montate su vetrini porta-oggetto e sottoposte alle seguenti colorazioni:

- Reattivo di Lugol (Pearce, 1985) per evidenziare la presenza di amido: 1 g di Iodio è stato sciolto in una soluzione al 2% di Ioduro di potassio. Una goccia di reattivo di Lugol è stata aggiunta al preparato, coperto con vetrino copri-oggetto e osservato al microscopio ottico Leitz. L'amido si colora di nero.
- Sudan III (Jensen, 1962) per evidenziare la presenza di lipidi. Una goccia di reattivo è stata aggiunta al preparato, coperto con vetrino copri-oggetto e osservato al microscopio ottico Leitz. I lipidi si colorano di nero.
- Blu di Toluidina (Carraro *et al.*, 1979) per evidenziare la presenza di proteine: la soluzione di Blu di Toluidina 0,5% in acido borico 1% è stata aggiunta al preparato. Il vetrino è stato scaldato alla fiamma fino alla comparsa di un alone verde, è stato poi lavato con acqua distillata. L'eccesso di colorante è stato eliminato con alcool 95%. I nuclei vegetativi e gli accumuli di proteine nei granuli appaiono neri.

Immuno oro marcatura.

Per la localizzazione degli allergeni mediante immuno-oro marcatura è stata seguita la procedura riportata in Canini *et al.* (2004).

Sezioni ultrasottili di polline incluso in resina, montate su retini di nichel, sono state preincubate in H₂O₂ 1% a faccia in giù su goccia per 5 min, lavate in PBS tween 0.1% per 5 min su goccia, incubate in BSA 5% in PBS tween 0.1% per 30 min su goccia. E' stato poi effettuato un lavaggio in PBS tween 0.1% e le sezioni sono state incubate con anticorpo primario. Come anticorpo primario sono state usate le frazioni di IgE dei soggetti allergici A, B, C e D, purificate dal siero, diluite 1:200 in BSA 1% PBS tween 0,1%, incubato su goccia a 4°C overnight in camera umida.

Dopo tre lavaggi in PBS tween 0.1% le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario, Rabbit-anti Human IgE, diluito 1:20 in BSA 1% in PBS tween 0.1% per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente, e poi

con anticorpo terziario Goat anti Rabbit coniugato con sfere d'oro colloidale da 10 nm di diametro, diluito 1:20 in BSA 1% in PBS tween 0.1% per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente. Sono seguiti due lavaggi in PBS tween 0.1% e due in H₂O bidistillata. I retini sono quindi stati asciugati e osservati al microscopio elettronico a trasmissione CEM Zeiss 902 a 80 kV.

La quantificazione della marcatura è stata effettuata secondo il metodo descritto da Taylor (Taylor *et al.*, 1994) e riportato in Canini *et al.* (2004): sono state contate le particelle d'oro in un quadrato di area 0.25 μm^2 , 20 misure in ciascun compartimento pollinico (ectexina, endexina, intina, citoplasma) per 3 granuli di polline diversi per ciascun campione. Da queste sono state sottratte le particelle d'oro contate nello stesso modo sulla resina fuori dal tessuto e nel polline di controllo, ed è stata calcolata la media e la deviazione standard.

Risultati

Monitoraggio pollinico a Tor Vergata dal 2002 al 2004

Nella Tabella 2 sono riportati i valori di concentrazione pollinica totale annua e delle concentrazioni annue di polline (esprese in granuli/m³ d'aria) prodotto dalle piante di maggior interesse allergenico, negli anni tra il 2002 e il 2004

	Anno 2002	Anno 2003	Anno 2004
Totale annuo	49460	52279	43775
Cupressaceae	13354	17637	7874
Fagaceae	6202	10077	4233
Urticaceae	6161	5940	6648
Gramineae	6131	4220	5852
<i>Quercus</i>	4275	8179	2705
Oleaceae	4067	2404	5493
Pinaceae	3039	3044	3547
<i>Olea</i>	3020	1935	3963
Corylaceae	2762	2686	4691
<i>Carpinus/Ostrya</i>	1928	1955	3963
<i>Castanea</i>	1887	1746	1461

Tab 2: Concentrazioni polliniche esprese in granuli di polline per metro cubo d'aria registrate negli anni tra il 2002 e il 2004 presso la Stazione di monitoraggio di Roma Tor Vergata. Sono riportate le concentrazioni totali annue e le concentrazioni annue di polline prodotto da famiglie e generi di piante di interesse allergenico.

Dai dati si notano le variazioni notevoli da un anno all'altro, ma dal confronto dei due trienni si può notare che per quanto riguarda le Fagaceae le variazioni osservate rispondono a cambiamenti ciclici. I valori massimi di concentrazione totale registrati si riferiscono all'anno 2003, con 52279 granuli/m³, mentre il valore minimo si osserva nel 2004 con 43775 granuli/m³.

Nella Figura 7 sono riportati i valori in percentuale relativa rispetto al totale annuo delle concentrazioni di polline prodotto dalle singole famiglie o

generi di piante anemofile e registrate dalla Stazione di monitoraggio di Roma Tor Vergata nel triennio 2002-2004.

Nonostante le variazioni di concentrazione osservate tra un anno e l'altro la famiglia delle Fagaceae risulta essere sempre la seconda produttrice di polline dopo quella delle Cupressaceae. Il solo genere *Quercus* determina una produzione di polline pari e a volte superiore (anno 2003) a quello prodotto dall'intera famiglia delle Gramineae.

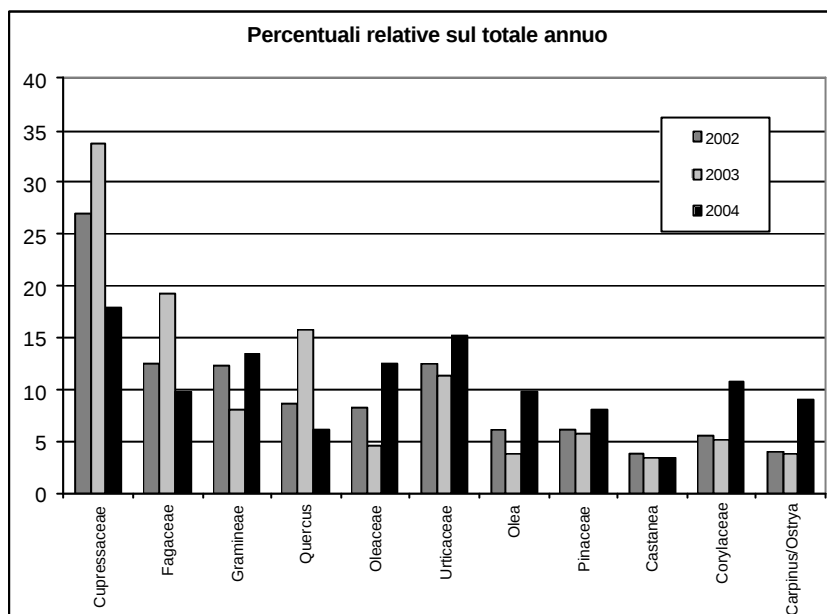


Fig 7: percentuale relativa rispetto al totale annuo delle concentrazioni di polline registrate presso il Centro di monitoraggio di Roma Tor Vergata.

Analizzando l'intero periodo di fioritura del genere *Quercus* si nota la sovrapposizione del periodo antesico con quelli di produzione pollinica, almeno per quanto riguarda l'inizio della pollinazione. Al termine del periodo antesico (fine maggio) si registra ancora una bassa quantità di polline di quercia nell'aria, dovuta probabilmente a risollevarimenti di granuli già depositi o all'arrivo di polline da zone più fredde, in cui la fioritura è stata ritardata (Figura 8).

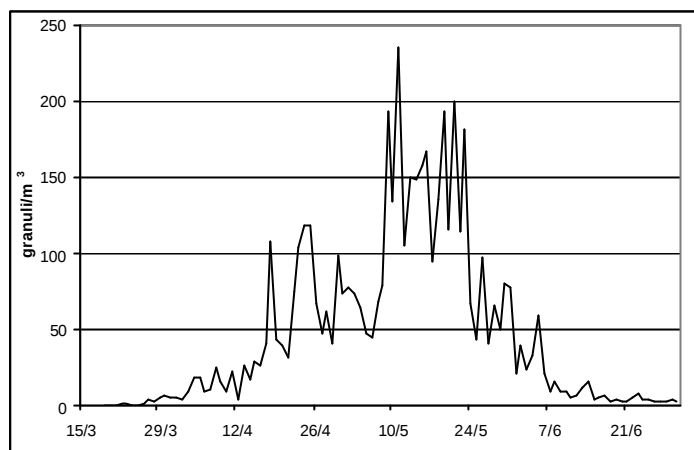


Fig. 8: Spettro pollinico (linea nera) e antesico (barra arancione) del genere *Quercus*. I valori di concentrazione di polline si riferiscono alla media delle concentrazioni calcolate nel triennio 2002-2004.

Screening soggetti allergici adatti alla ricerca, monitoraggio delle allergie e test allergologici cutanei, prelievo di sangue e purificazione frazione IgE dal siero

Nel 2002 sono stati elaborati statisticamente i dati ottenuti dai questionari distribuiti mediante il monitoraggio delle allergie condotto a Tor Vergata dal 1999 al 2002. Durante tale indagine sono stati distribuiti circa 7000 questionari di cui 2711 sono stati compilati.

Il campione era equamente ripartito per sesso, mentre la fascia di età prevalente era quella tra 20 e 30 anni, perché il campione era costituito da studenti.

1191 soggetti (il 44% del campione totale) dichiaravano di soffrire di almeno uno dei sintomi clinici elencati nel questionario, pertanto sono stati considerati allergici. I sintomi clinici più frequenti erano rinite stagionale (42% dei soggetti allergici), dermatite (38%) e orticaria (16%).

L'89% dei soggetti che si dichiaravano allergici aveva consultato un medico e solo il 70% di essi aveva ricevuto diagnosi di allergia. Le allergie diagnosticate erano dovute a polline nel 30% dei casi, ad altri allergeni nel 40% dei casi e a entrambi nel 26% dei casi.

Sul campione totale comprendente allergici e non allergici, i soggetti con diagnosi di allergia erano il 27% (741 soggetti), e quelli con diagnosi di pollinosi erano il 15% (402 soggetti).

Il 71% dei soggetti con diagnosi di pollinosi indicava il polline di Gramineae come responsabile della patologia, il 32% la *Parietaria*, il 20% le Oleaceae. Solo il 4% dei soggetti allergici dichiarava di essere sensibile al polline di Fagaceae.

Al fine di condurre esperimenti di immuno-oro marcatura al microscopio elettronico a trasmissione, la frazione relativa alle IgE è stata purificata dalle altre frazioni di immunoglobuline presenti nei sieri.

Nella Tabella 3 sono riportati i dosaggi delle frazioni di IgE separate dai sieri dei pazienti A, B, C e D, allergici alle Fagaceae. Il siero del soggetto E non è stato purificato perchè non era ancora disponibile al momento dell'esperimento.

	Siero	IgE 1	IgE 2	Non allergico	No siero
A	191	115	27	18	0
B	238	235	86	12	0
C	339	317	68	17	2
D	2039	1728	99	56	9

Tab 3: Densità ottica misurata alla λ di 495 nm per le frazioni di IgE purificate dal siero dei soggetti allergici al polline di Fagaceae.

Estrazione proteine di leccio, da polline e foglie

a. Proteine da polline

Il dosaggio delle proteine ha dato valori di concentrazione proteica nell'estratto di polline dializzato compresa tra 100 e 300 $\mu\text{g/ml}$, dipendentemente dall'efficienza dell'estrazione.

Il dosaggio delle proteine ha dato valori di concentrazione proteica nell'estratto di polline non dializzato compresa tra 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$, dipendentemente dall'efficienza dell'estrazione.

b. proteine da foglie

Il dosaggio delle proteine ha dato valori di concentrazione proteica nell'estratto di foglie di circa 1 mg/ml.

SDS-PAGE e Western Blotting

a. Proteine da polline

I sieri dei soggetti allergici sono stati sottoposti a reazione con le proteine estratte dal polline di leccio mediante SDS-PAGE e western blotting.

Nell'esperimento condotto utilizzando come secondario l'anticorpo coniugato con I_{125} , l'estratto proteico utilizzato per la corsa elettroforetica era stato dializzato. Nell'esperimento sono stati utilizzati i sieri dei pazienti A, B, C e D perchè il siero del paziente E non era ancora disponibile.

Solo i sieri C e D riconoscevano una banda nell'estratto, con peso molecolare di circa 9,5 kDa (Figura 9).

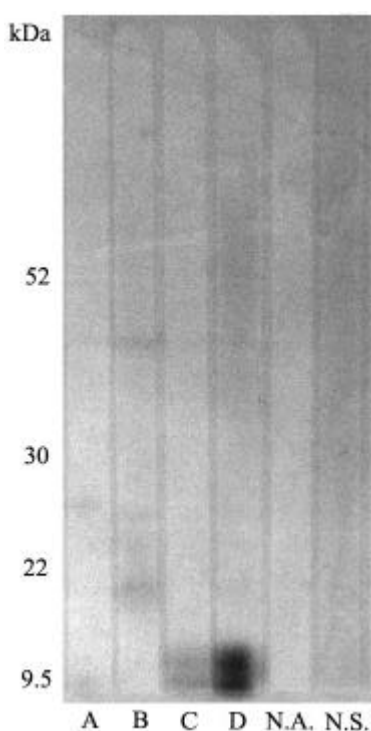


Fig. 9: risultato dell' SDS PAGE con proteine estratte dal polline di leccio e Western Blotting con i sieri dei soggetti A, B, C e D, allergici alle Fagaceae. L' anticorpo secondario era coniugato con I_{125} . (N.A. = siero di soggetto non allergico; N.S. = controllo senza siero).

Lo stesso esperimento di western blotting è stato condotto utilizzando solo i sieri dei soggetti C e D e come secondario l'anticorpo coniugato con perossidasi. I due sieri riconoscevano solo una banda di peso molecolare 9,5 kDa.

La banda di peso molecolare pari a 9,5 kDa è stata successivamente isolata e sequenziata.

Nei successivi esperimenti stati utilizzati estratti proteici non dializzati. Nella Figura 10 sono riportati i risultati delle corse elettroforetiche dell'estratto proteico di polline di leccio, dializzato (a) e non dializzato (b).

In entrambi i casi sono stati caricati sul gel 20 µg di proteine.

Nell'estratto non dializzato si osservano un numero maggiore di bande di peso molecolare compreso tra 20 e 35 kDa, e bande più intense a pesi molecolari maggiori di 35 kDa.

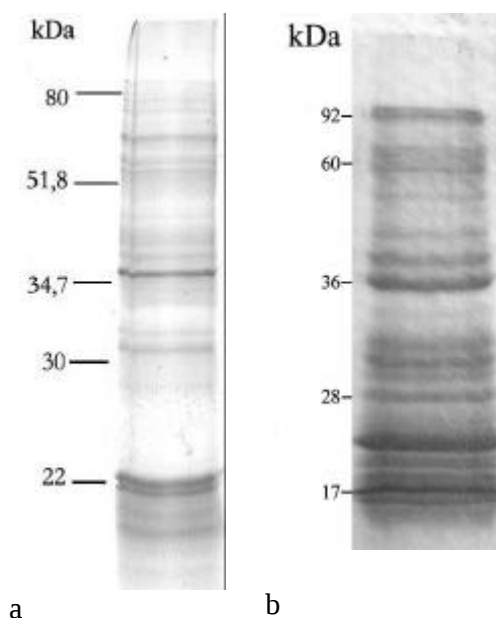


Fig. 10. Risultati dell'SDS-PAGE effettuata con estratti proteici di polline di leccio. (a) estratto dializzato, 20 µg; (b) estratto non dializzato, 20 µg.

Visto che l'estratto proteico non sottoposto a dialisi presentava un numero maggiore di bande, sono stati fatti reagire i sieri dei soggetti allergici con tale estratto in esperimenti di western blotting.

Nella Figura 11 sono riportati i risultati di tali esperimenti, nei quali sono stati utilizzati i sieri dei pazienti A, B, D ed E perchè il siero del paziente C non è stato sufficiente.

I sieri riconoscevano più proteine nell'estratto. Due bande con pesi molecolari di circa 36 e 28 kDa sono state riconosciute da tutti i sieri, e sono state riconosciute sia quando l'esperimento è stato condotto in condizioni riducenti (con l'aggiunta di 2-β-mercaptoetanolo nel buffer di corsa dell'estratto proteico) (Figura 11a), sia in condizioni non riducenti (senza 2-β-mercaptoetanolo) (Figura 11b).

La banda di peso molecolare 9,5 che era stata identificata nell'estratto proteico sottoposto a dialisi, non veniva riconosciuta nell'estratto proteico non dializzato.

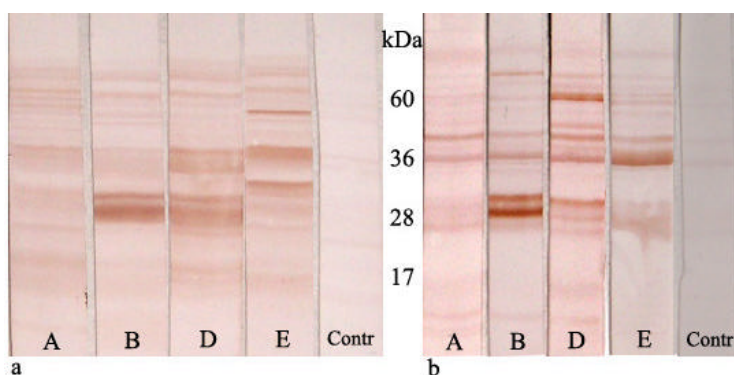


Fig 11: risultato dell' SDS PAGE con proteine estratte dal polline di leccio e Western Blotting con i sieri dei soggetti A, B, D ed E, allergici alle Fagaceae (Contr = controllo senza siero). (a): esperimento condotto in condizioni riducenti; (b): esperimento condotto in condizioni non riducenti.

b. Proteine da foglie

Per determinare se le proteine riconosciute dai sieri dei soggetti allergici alle Fagaceae fossero espresse esclusivamente nel polline o anche in altri tessuti della pianta di leccio, i sieri dei soggetti allergici sono stati sottoposti

a reazione con le proteine estratte dalle foglie di leccio mediante SDS-PAGE e western blotting.

Nella Figura 12 è riportato il risultato dell'SDS PAGE con proteine estratte da foglie di leccio e immunoprecipitazione con il siero dei soggetti D ed E, allergici al polline di Fagaceae. Sono stati utilizzati solo i sieri D ed E perchè reagivano con intensità maggiore con l'estratto proteico del polline, e erano i sieri disponibili in quantità maggiore.

Il siero D ha riconosciuto due bande di peso molecolare pari a circa 24 e 61 kDa; il siero E ha riconosciuto debolmente una banda di peso molecolare pari a circa 46 kDa. Nessuno dei due sieri usati è immunoprecipitato con le stesse bande che erano state riconosciute nell'estratto proteico del polline.

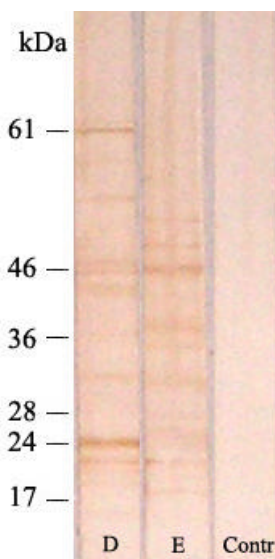


Fig 12: risultato dell'SDS PAGE con proteine estratte dalle foglie di leccio e Western Blotting con i sieri dei soggetti D ed E, allergici alle Fagaceae. Contr = controllo senza siero.

ELISA e ELISA con deglicosilazione

I saggi ELISA hanno mostrato che tutti e cinque i sieri reagivano con l'estratto proteico del polline di leccio, anche se con differenti attività. La Figura 13 mostra la densità ottica ottenuta.

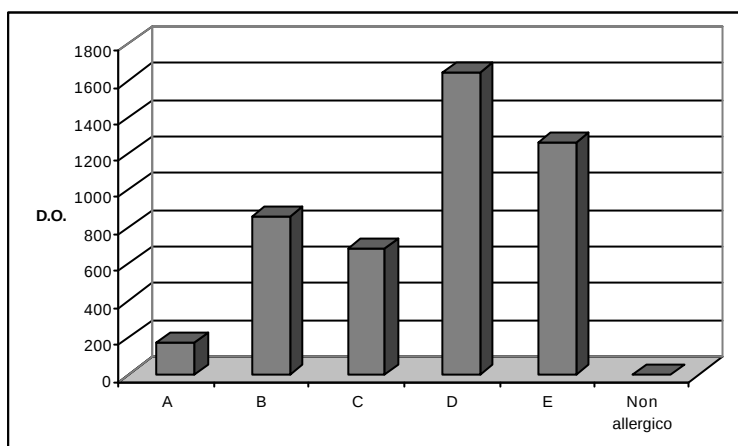


Fig 13: reattività dei sieri con l'estratto proteico del polline di leccio in ELISA

Saggi ELISA sono stati condotti anche con l'estratto proteico del polline di altre specie di Fagaceae, per determinare la cross-reattività tra essi. A tal fine sono stati utilizzati estratti proteici del polline di farnia, castagno e faggio.

Come si nota dalla Figura 14 dove sono riportati i valori di densità ottica ottenuta, i sieri A, B, C e D hanno mostrato reattività bassa con l'estratto proteico di polline di farnia e castagno, reattività maggiore con l'estratto proteico del polline di faggio. In particolare il siero del soggetto D ha mostrato reattività molto alta con l'estratto proteico del polline di faggio. Il siero del paziente E non è stato utilizzato perchè al momento dell'esperimento non era ancora disponibile.

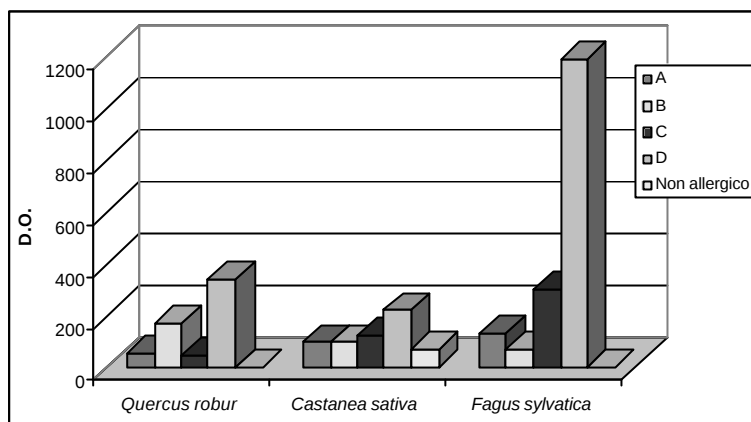


Fig 14: Reattività dei sieri con estratti proteici del polline di farnia, castagno e faggio.

I saggi ELISA in cui è stato usato il periodato per ossidare le eventuali porzioni zuccherine delle proteine allergeniche hanno mostrato che la reattività dei sieri A, C, D ed E nei confronti dell'estratto proteico del polline di leccio diminuiva ma non veniva annullata, mentre quella del siero B rimaneva pressoché costante. Nessuna reazione si osservava nel controllo, effettuato con il siero di un soggetto non allergico. La Tabella 4 riporta le densità ottiche misurate per la reattività dei sieri nei confronti delle proteine, in condizioni native e dopo trattamento con periodato.

	PBS tween	Non deglicosilato	Deglicosilato
A	65	64	32
B	169	200	164
C	191	187	69
D	448	441	310
E	351	348	305
Non allergico	0	0	0
Contr. senza siero	8	5	7

Tab 4: Densità ottica misurata nell'esperimento di deglicosilazione delle proteine del polline di leccio, in ELISA. (la colonna relativa a PBS tween contiene le D.O. misurate come ulteriore controllo per il confronto con l'ELISA condotta nelle condizioni standard)

Sequenziamento

La sequenza aminoacidica della proteina di peso molecolare pari a 9,5 kDa, riconosciuta nell'esperimento di western blotting con I₄₂₅ è risultata essere la seguente (sono riportate le abbreviazioni a tre lettere dei nomi degli aminoacidi):

Met-Gln-Ile-Phe-Val-Lys-Thr-Leu-Thr-Gly-Lys-Thr-Ile-Leu-Glu-Val-Glu-

Il procedimento utilizzato ha permesso l'identificazione di 18 aminoacidi N-terminali.

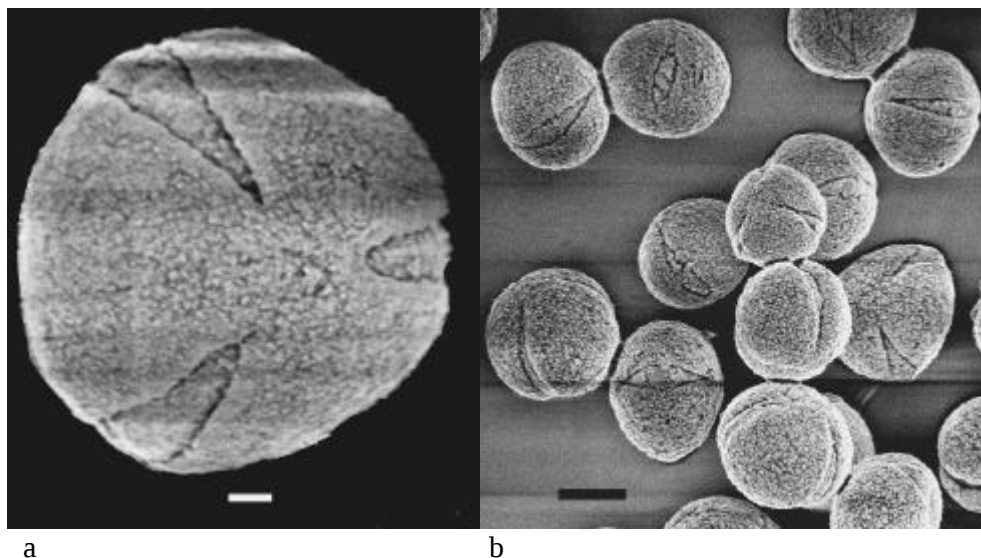
La comparazione della sequenza ottenuta con sequenze di proteine conosciute ha rivelato che la proteina era l'ubiquitina.

Indagini strutturali e ultrastrutturali del polline: il polline al SEM

All'osservazione al SEM il polline di leccio (Figura 15) appariva di dimensioni medie (20-25 μm di diametro), con tre aperture composte da poro e colpo (tricolporato), ed esina scabrata con sculturazioni poco pronunciate. Si notano sulla superficie dell'esina delle microperforazioni diffuse in modo omogeneo (Figura 15c).

Il polline di castagno (Figura 16) appariva di piccole dimensioni, con un diametro maggiore di 10-12 μm . Si presentava tricolporato, con esina rugulata e sculturazioni poco profonde.

Il polline di faggio (Figura 17) era di grandi dimensioni (40-45 μm di diametro), tricolporato, con grandi pori e colpi corti e sottili. L'esina era sottile e rugulata, con sculturazioni evidenti.



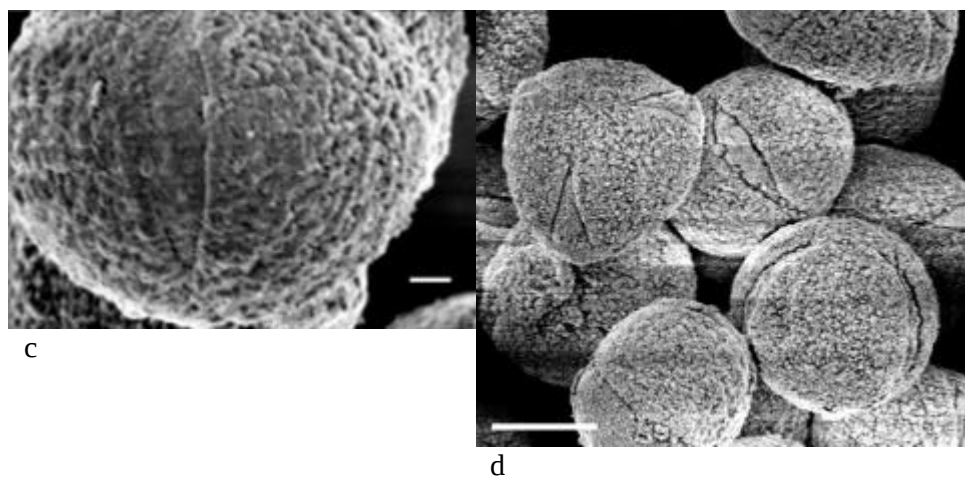
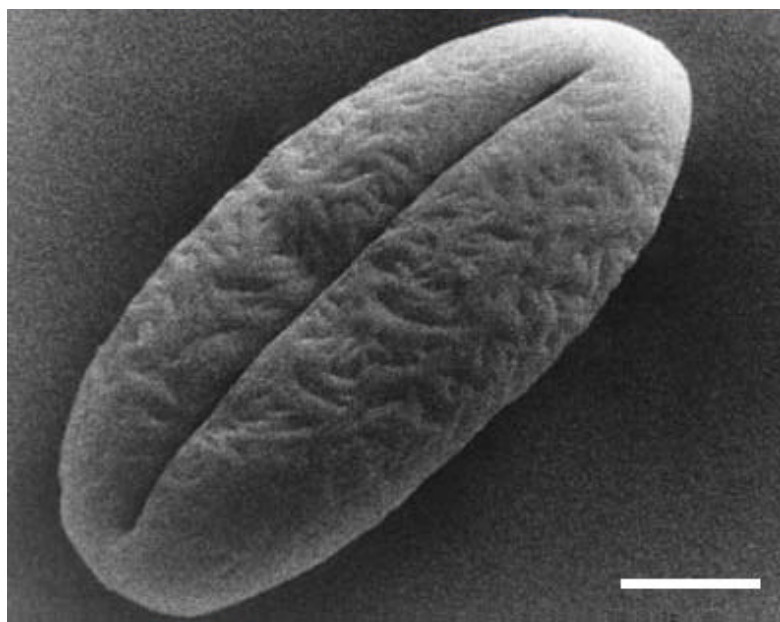
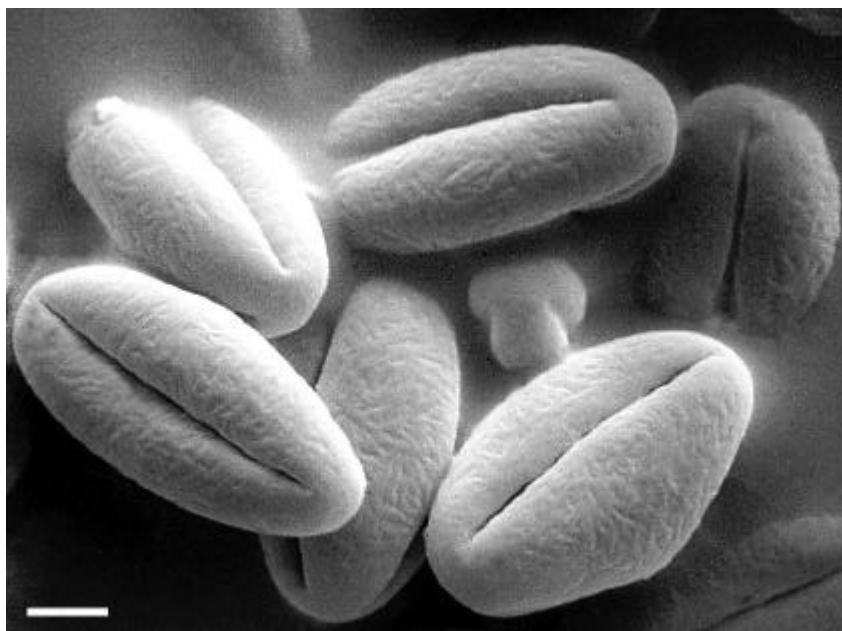


Fig. 15: Polline di leccio osservato al microscopio elettronico a scansione; a: granulo intero, sono visibili i colpi (bar = 2 μm); b: alcuni granuli (bar = 10 μm); c: particolare dell'esina, sono visibili le microperforazioni (bar = 2 μm); d: alcuni granuli in cui si evidenzia la sculturazione scabrata dell'esina (bar = 10 μm).



a



b

Fig. 16: Polline di castagno osservato al microscopio elettronico a scansione; a: granulo in cui è messo in evidenza un colpo lungo e sottile (bar = 2 μm); b: numerosi granuli, è evidenziata l'esina rugulata (bar = 2 μm).

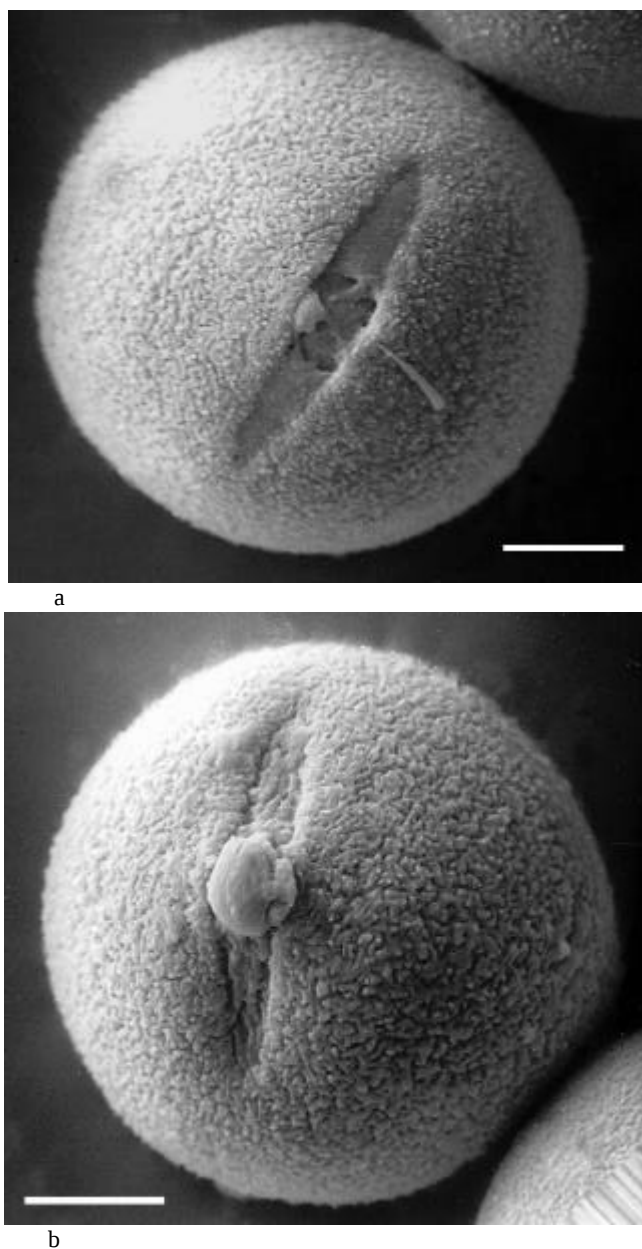


Fig. 17: Polline di faggio osservato al microscopio elettronico a scansione; a: si nota il grande poro e il colpo corto e sottile (bar = 9 μm); b: è messa in evidenza la sculturazione rugulata dell'esina, molto pronunciata (bar = 10 μm).

Colorazioni citochimiche al MO

Su granuli interi di polline di leccio conservato a -20°C e su sezioni semifini (400-600 nm) di polline di leccio fissato in glutaraldeide in tampone cacodilato e incluso in resina epossidica (Spurr, 1969) sono state condotte le seguenti colorazioni citochimiche allo scopo di evidenziare i siti di accumulo di polisaccaridi, amido, lipidi, proteine e dei nuclei delle cellule vegetativa e germinativa. I preparati osservati al MO hanno dato i seguenti risultati:

- Lugol: reazione negativa, assenza di amido (Figura 18a).
- Sudan III: reazione positiva: presenza di lipidi concentrati in quantità variabile secondo i granuli e le sezioni (Figura SUD).
- Blu di Toluidina: il polline appariva bicellulare con assenza di evidenti inclusi di tipo proteico.

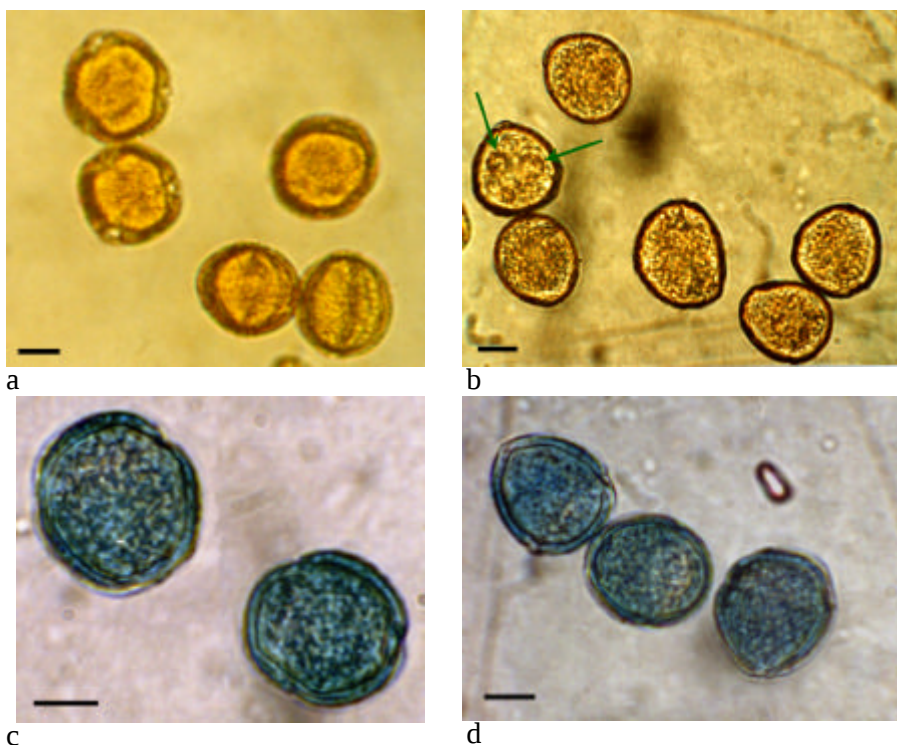


Fig. 18: Granuli di polline di leccio dopo colorazioni citochimiche per microscopio ottico. a: reattivo di Lugol: non sono visibili riserve di amido (bar = 10 μm); b: Sudan III: è messa in evidenza la presenza di lipidi (indicati da frecce) concentrati in alcuni granuli (bar = 10 μm); c e d: Blu di Toluidina: non sono presenti evidenti inclusi proteici (bar = 10 μm).

Polline al TEM dopo inclusione convenzionale e dopo freeze-substitution

Allo scopo di chiarire il ruolo degli allergeni del polline di leccio nella biologia riproduttiva della pianta sono state condotte osservazioni sulla ultrastruttura del polline e sulla localizzazione degli allergeni.

A tal fine sono stati adottati due tipi di fissazione e inclusione: la preparazione convenzionale con fissazione in glutaraldeide in tampone acquoso e inclusione in resina epossidica, e la freeze-substitution, con fissazione a freddo e inclusione in resina acrilica.

La preparazione convenzionale ha permesso una buona conservazione dell'ultrastruttura del polline, osservabile nella figura 19.

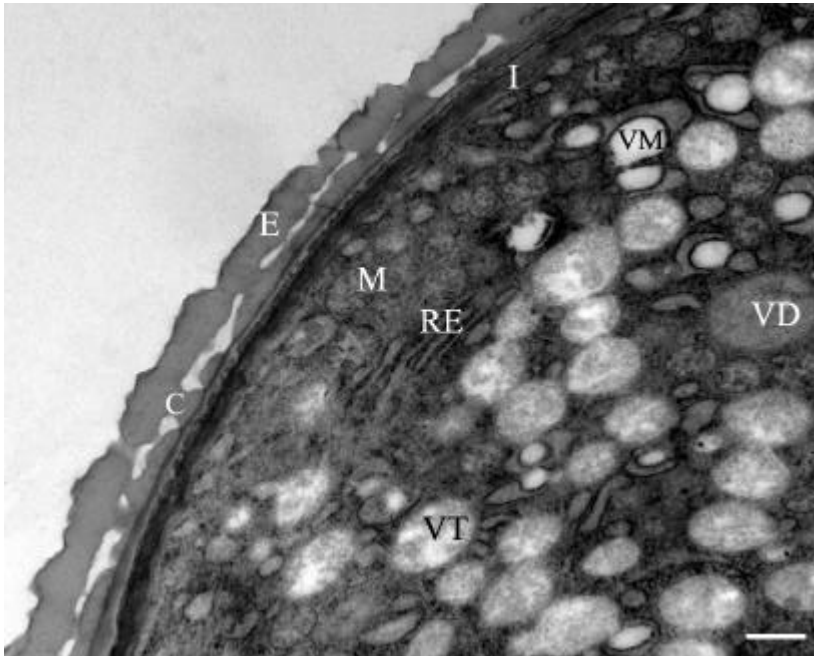


Fig 19: Sezione di polline di leccio processato con inclusione convenzionale. Sono visibili l'esina (E) che presenta uno strato esterno detto *tectum*, sostenuto da corte columelle (C) che delimitano piccoli spazi intercolumnellari, l'intina (I), numerosi mitocondri (M), cisterne del reticolo endoplasmatico (RE), vescicole ricoperte da membrana derivata da espansioni del reticolo endoplasmatico (VM), vescicole elettrone trasparenti (VT) e vescicole elettrondense (VD). Bar = 1µm.

In leccio l'esina scabrata presentava un profilo esterno non lineare ma ondulato con *tectum* interrotto da scarse aperture. Le columelle apparivano corte e spesse, gli spazi intercolumnellari ridotti in numero e dimensioni, e apparentemente privi di contenuto. Lo strato basale era invece continuo e spesso. L'esina si assottigliava in corrispondenza dei colpi, fino a mancare del tutto in corrispondenza delle aperture (Figura 20).

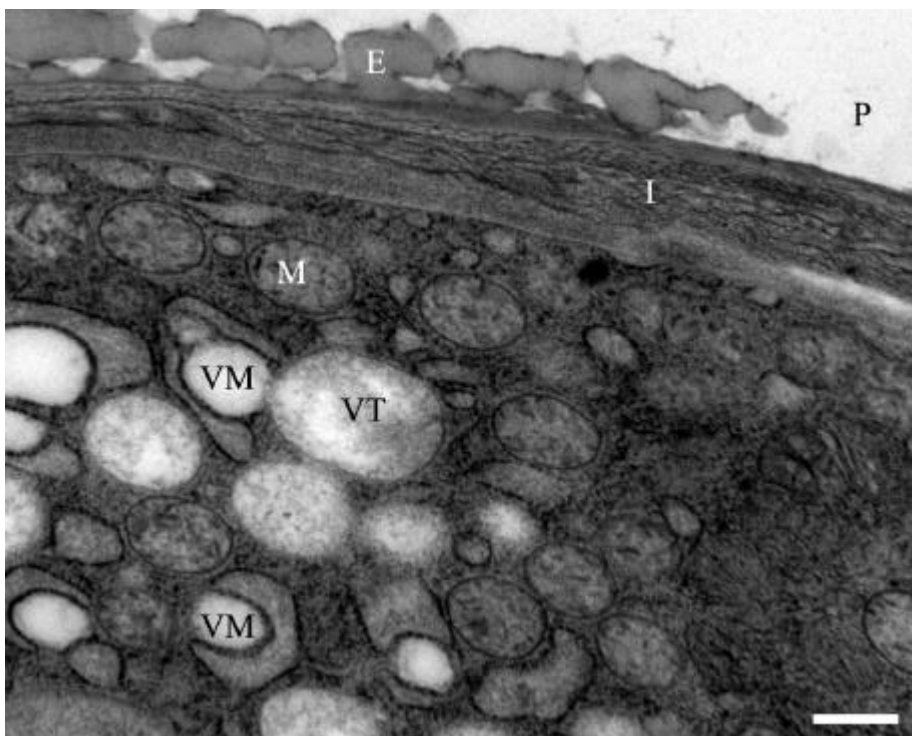


Fig 20: Sezione di polline di leccio processato con inclusione convenzionale. E' visibile l'esina (E) che si assottiglia e si interrompe in corrispondenza dei pori (P), l'intina fibrillare (I), numerosi mitocondri (M), vescicole citoplasmatiche elettronttrasparenti (VT) e vescicole ricoperte da membrana derivata da espansioni del reticolo endoplasmatico (VM). Bar = 1 μ m.

L'intina presentava un sottile strato più esterno trasparente agli elettroni, ondulato nella parte interna, e uno strato più interno elettrondenso e fibrillare. Nel citoplasma erano evidenti mitocondri, numerose vescicole

elettrontrasparenti, talune avvolte da membrana, probabilmente derivate da dilatazioni del reticolo endoplasmatico e vescicole ricche di materiale granuloso diffuso (Figura 21).

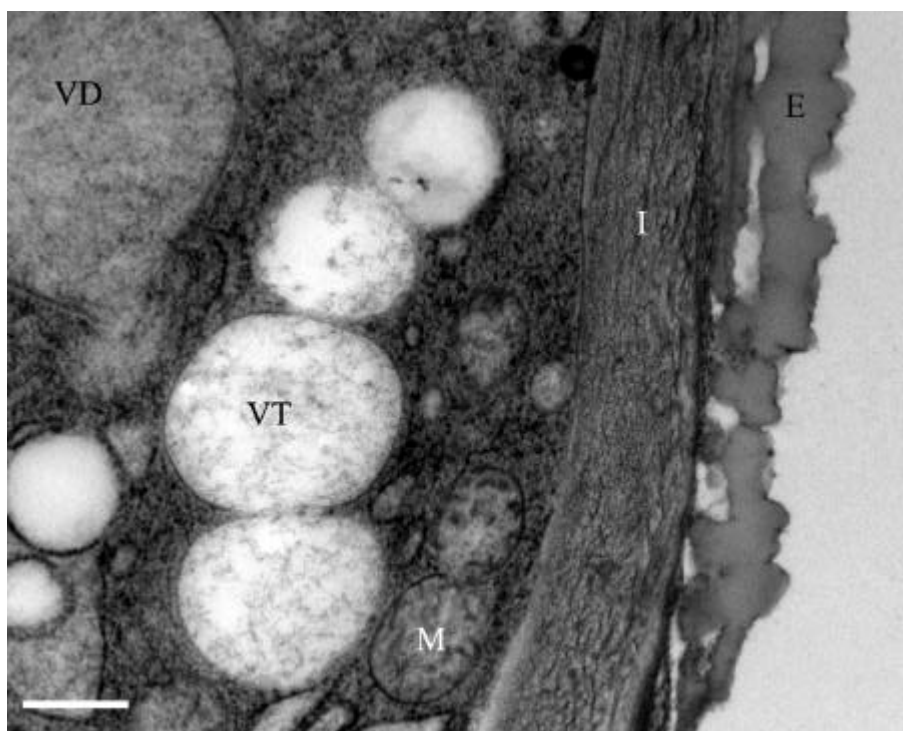


Fig 21. Sezione di polline di leccio processato con inclusione convenzionale. Sono messi in evidenza l'esina con *tectum* (E), l'intina fibrillare (I), mitocondri (M) e vescicole citoplasmatiche elettrontrasparenti (VT) ed elettrondense (VD). Bar = 1 μ m.

In alcune sezioni erano ben visibili vescicole il cui contenuto probabilmente lipidico potrebbe essere stato eliminato durante le procedure di preparazione. Di esso rimane traccia sotto forma di goccioline molto elettrondense ai bordi di vacuoli (Figura 22).

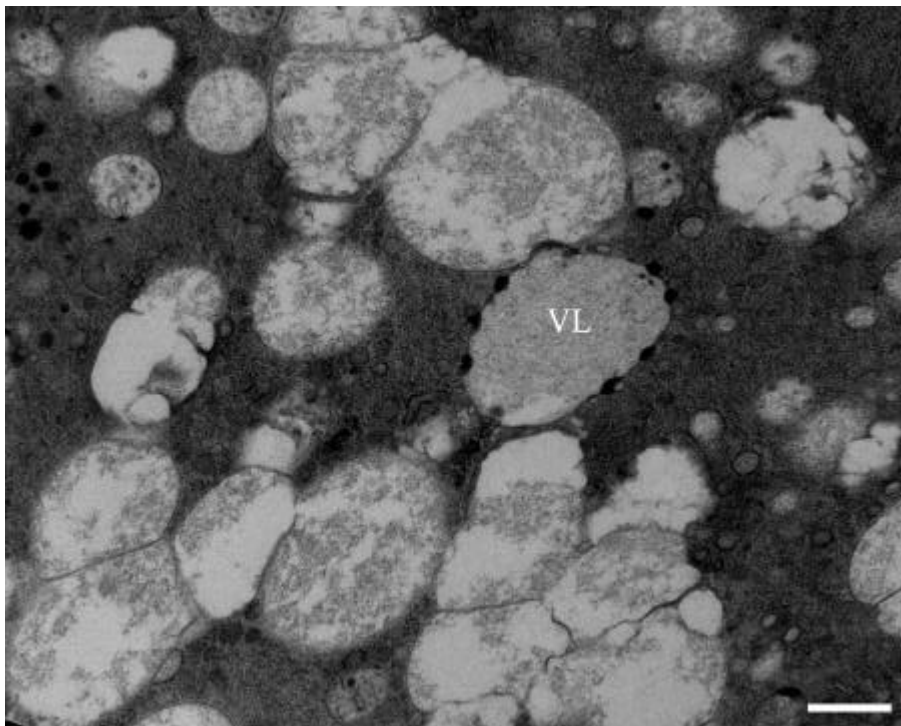


Fig 22. Sezione di polline di leccio processato con inclusione convenzionale. É evidente la presenza di vescicole ricche di materiale elettrondenso diffuso e di vescicole con gocce lipidiche ai bordi (VL). Bar = 1 μ m.

Dopo colorazione con Thiery si notavano elementi colorati, perciò risultavano presenti polisaccaridi con gruppi riducenti vicinali (Figura 23).

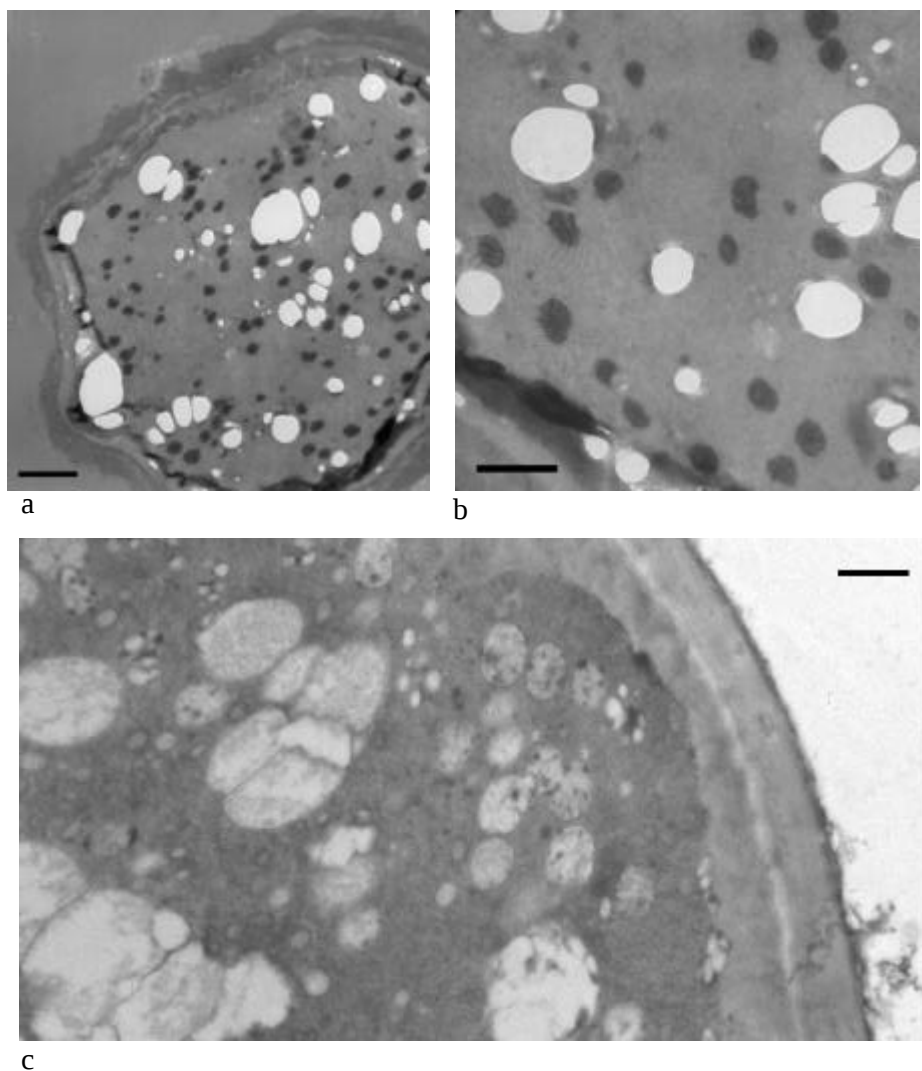


Fig. 23: sezioni di polline di leccio dopo colorazione con Thiery. Sono presenti polisaccaridi evidenziati dalla colorazione elettrondensa. a: Bar = 2 μ m. b: particolare del citoplasma (bar = 1 μ m). c: controllo non colorato, (bar = 1 μ m).

Localizzazione degli allergeni dopo inclusione convenzionale

La Figura 24 mostra una sezione ultrasottile del polline di leccio processato mediante inclusione convenzionale, cioè fissato in glutaraldeide e

incluso in resina epossidica, dopo immuno-oro marcatura. L'anticorpo primario usato era costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico B.

La marcatura d'oro appariva diffusa sia sulla parete (esina e intina), sia nel citoplasma del granulo, in maniera uniforme.

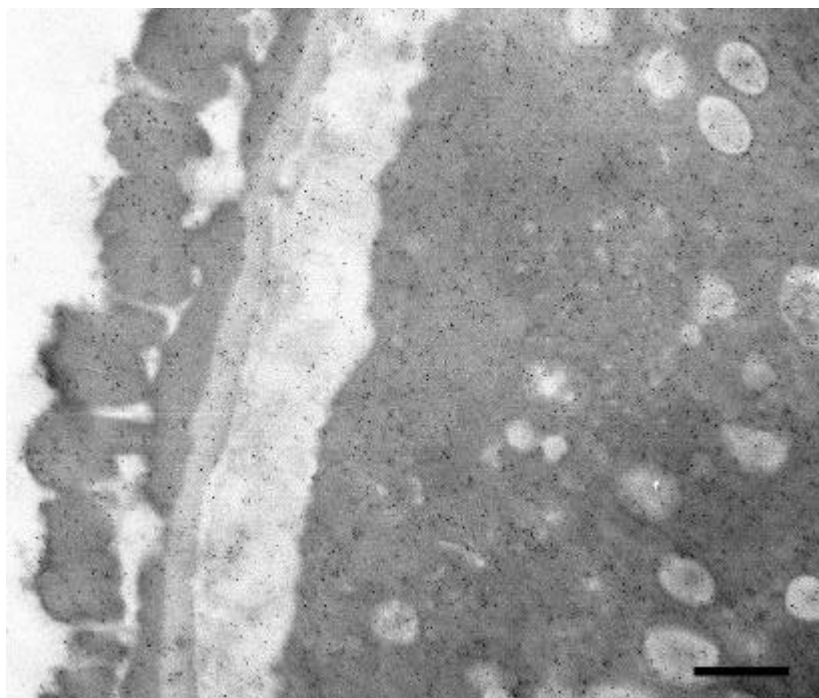


Fig 24: Risultato dell'immuno-oro marcatura su sezione ultrasottile di polline di leccio fissato con glutaraldeide e incluso in resina epossidica. Come anticorpo primario è stata usata la frazione di IgE purificata dal siero B. La marcatura è diffusa su tutto il granulo in modo omogeneo. Bar = 1 μ m.

L'immuno-oro marcatura effettuata con le IgE separate dai sieri dei soggetti allergici A, C e D hanno avuto risultati molto simili: marcatura diffusa in modo omogeneo su tutta la superficie del granulo e sulla sua parete. Le Figure che seguono riportano i dati di tale marcatura e il relativo controllo effettuato senza il siero, per i sieri dei pazienti A (Figura 25) e C (Figura 26a) e D (Figura 26b) Nella Figura 27 è riportato il controllo

dell'esperimento di immuno-oro marcatura, nel quale è presente una bassa marcatura aspecifica di cui si è tenuto conto nella quantificazione.

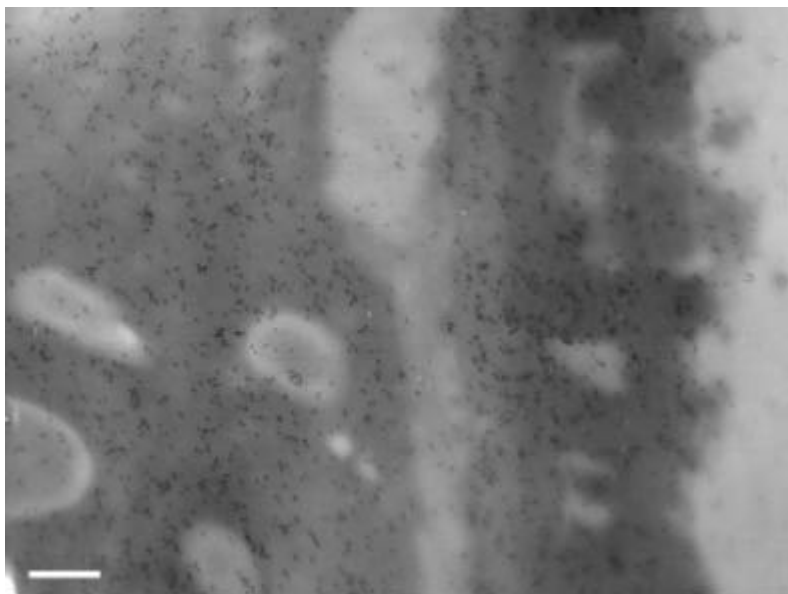


Fig 25: Risultato dell'immuno-oro marcatura su sezione ultrasottile di polline di leccio fissato con glutaraldeide e incluso in resina epossidica. Come anticorpo primario è stata usata la frazione di IgE purificata dal siero A. La marcatura è diffusa su tutto il granulo in modo omogeneo. Bar = 1 μ m.

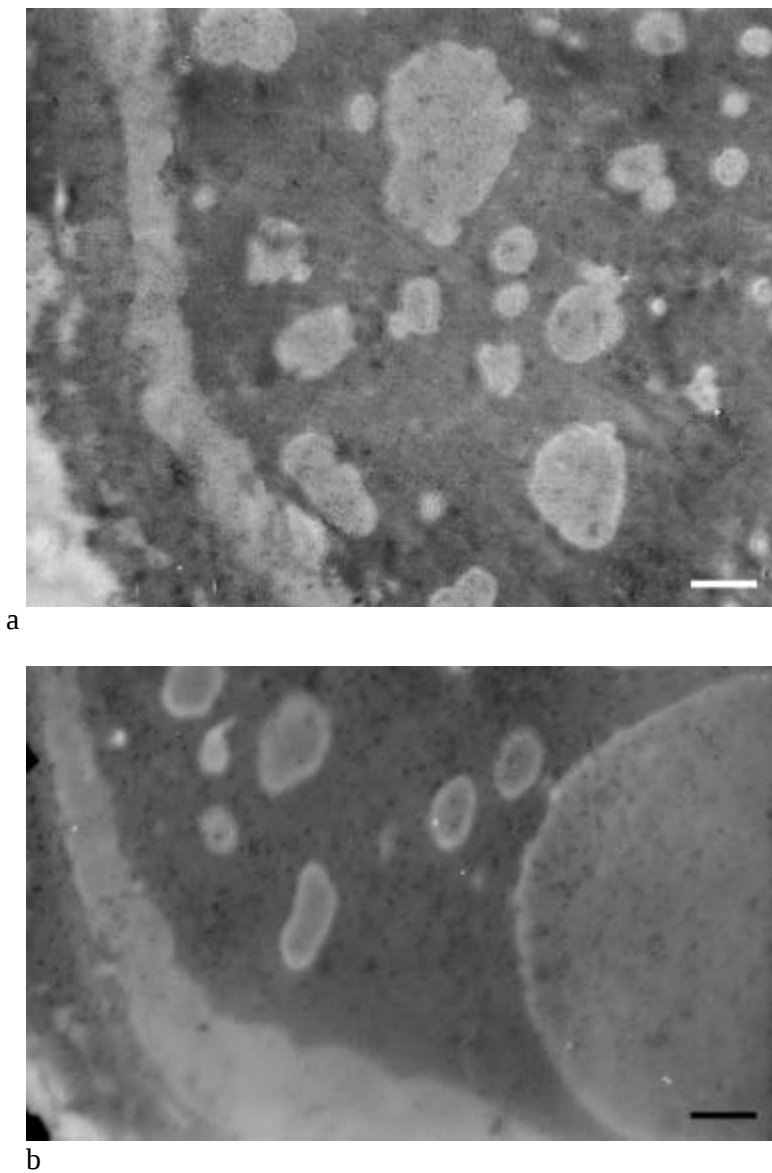


Fig 26: Risultato dell'immuno-oro marcatura su sezione ultrasottile di polline di leccio fissato con glutaraldeide e incluso in resina epossidica. Come anticorpo primario è stata usata la frazione di IgE purificata dal siero C (a, bar = 1 μ m) e del siero D (b, bar = 1 μ m). In entrambi i casi la marcatura è diffusa su tutto il granulo in modo omogeneo, su parete, citoplasma e nucleo.

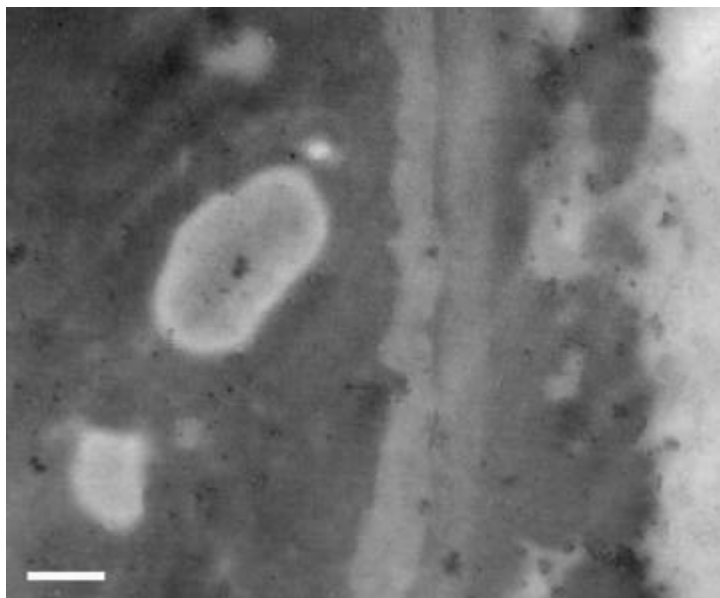


Fig. 27: Immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di leccio. Controllo senza il siero, sono visibili poche particelle d'oro relative a una reazione aspecifica, delle quali si è tenuto conto nella quantificazione della marcatura presente sui campioni. Bar = 1 μ m.

Per verificare l'esistenza di cross-reattività tra polline di specie diverse appartenenti alla famiglia delle Fagaceae, sono stati condotti esperimenti di immuno-oro marcatura su sezioni di polline di castagno e faggio processati con la stessa tecnica. Nella Figura 28 sono riportati i risultati di tale marcatura. Come anticorpo primario è stata usata solo la frazione di IgE purificata dal siero del soggetto B.

Anche nel polline di castagno (Fig. 28a) e in quello di faggio (Fig. 28b) la marcatura d'oro appariva diffusa sia sulla parete (esina e intina) del granulo, sia nel citoplasma, in maniera uniforme.

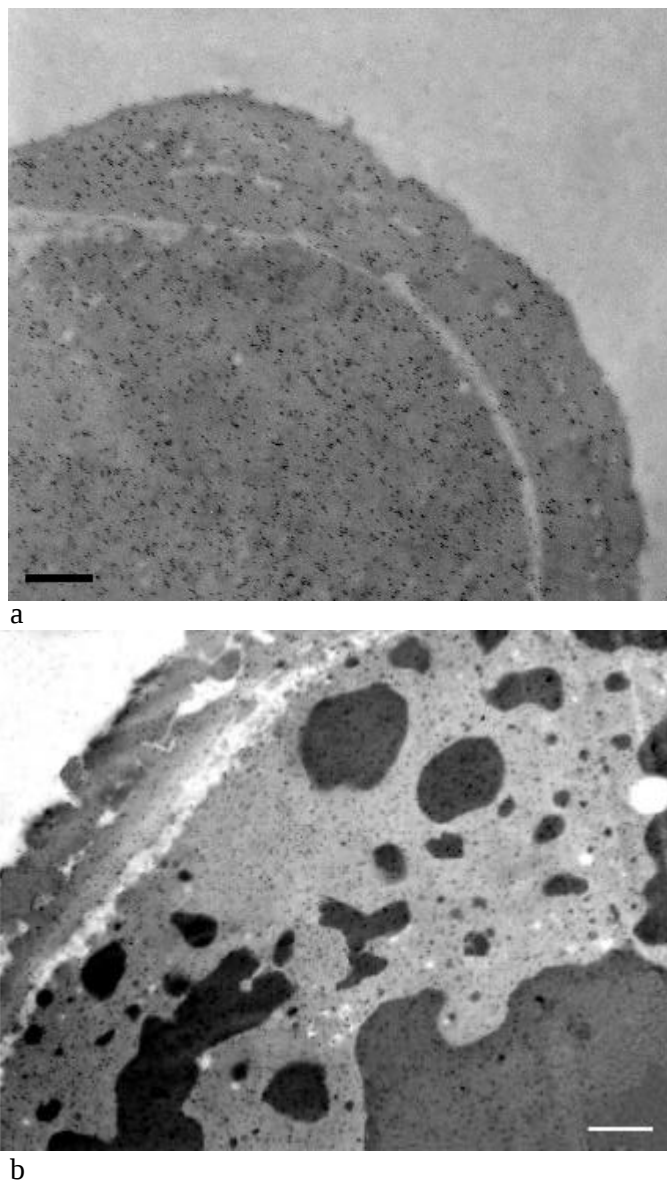


Fig 28: verifica della cross-reattività tra pollini di specie diverse mediante immuno-oro marcatura con IgE del soggetto allergico B. a: sezione di polline di castagno, le particelle d'oro sono diffuse su tutto il granulo (Bar = 1 μm). b: sezione di polline di faggio, le particelle d'oro sono diffuse su tutto il granulo (Bar = 1,2 μm)

Localizzazione degli allergeni dopo Freeze substitution e inclusione in resina acrilica

La diffusione della marcatura degli allergeni pollinici riscontrata nelle tre Fagaceae ha suggerito che tale distribuzione potesse dipendere da una mobilitazione degli allergeni a seguito della fissazione in tampone acquoso. Per verificare tale aspetto è stata usata una fissazione del polline a freddo.

Il polline fissato a freddo e incluso in resina acrilica conservava una buona organizzazione. Infatti la parete del granulo appariva ben conservata, gli organelli citoplasmatici e vescicole ben definiti e con membrane intatte (Figura 29).

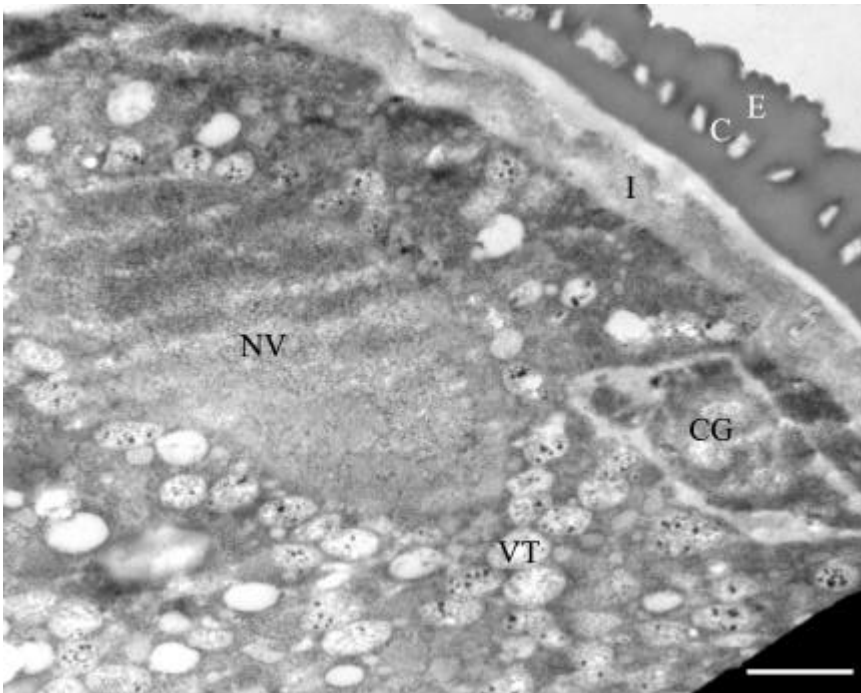


Fig 29: sezione di polline di leccio processato con la freeze-substitution e inclusione in resina acrilica. È ben conservata l'esina (E), si evidenziano le columelle (C), l'intina (I), il nucleo vegetativo (NV), la cellula generativa (GG). Il citoplasma è ricco di vescicole elettrortrasparenti (VT). Bar = 1µm.

Su tale materiale si è proceduto alla immuno-oro marcatura utilizzando come anticorpo primario la frazione di IgE purificata dai sieri dei soggetti allergici A, B, C e D.

La Figura 30 mostra sezioni ultrasottili di polline di leccio fissate mediante freeze-substitution e incluse in resina acrilica, dopo immuno-oro marcatura. L'anticorpo primario usato era costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico B.

L'osservazione al TEM ha evidenziato la presenza di marcatura nel citoplasma, a livello delle vescicole elettroneopache, e sull'intina. E' da notare la mancanza di marcatura a livello dell'esina (Figura 30)

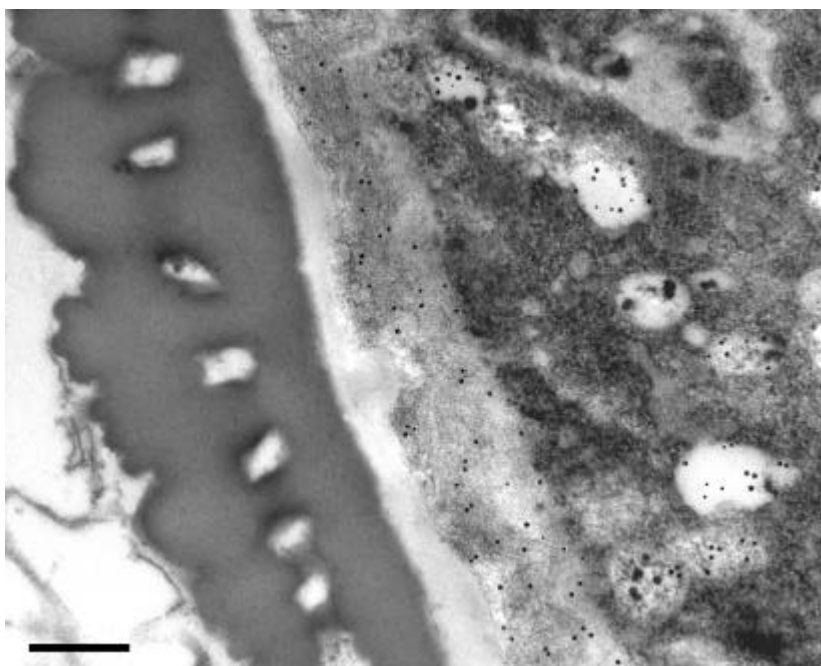
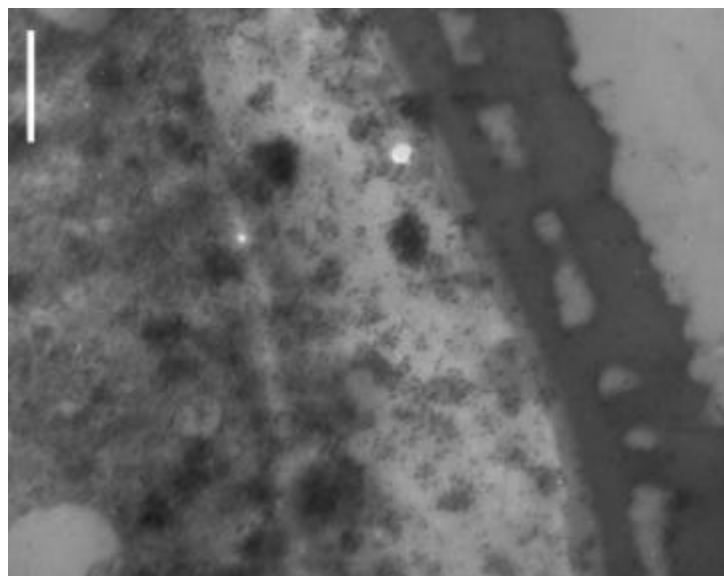


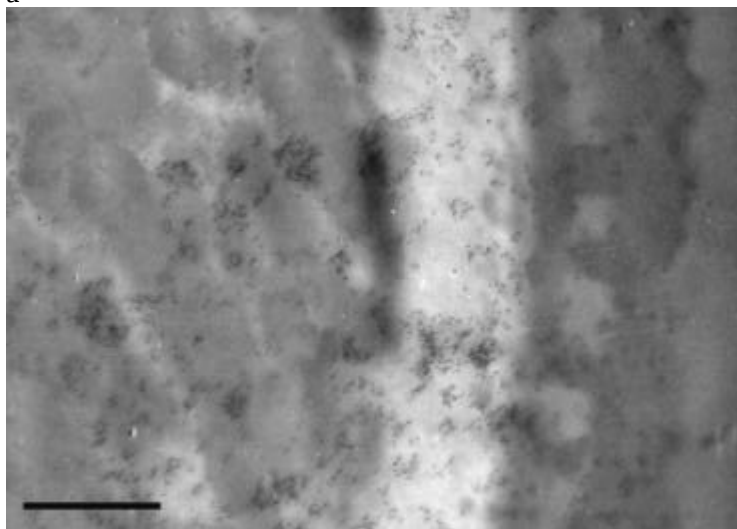
Figura 30: Risultato dell'immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di leccio processati mediante freeze-substitution e inclusione in resina acrilica. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico B. Bar = 0.5 μ m.

Esperimenti di immuno-oro marcatura sono stati condotti sullo stesso materiale anche con le IgE separate dal siero dei pazienti A, C e D,

producendo gli stessi risultati osservabili nelle Figure che seguono. La figura 33 mostra il controllo dell'esperimento nel quale non è presente marcatura.



a



b

Fig. 31: Risultato dell'immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di leccio processati mediante freeze-substitution e inclusione in resina acrilica. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico A

(a, bar = 1 μm) e del soggetto allergico C (b, bar = 1 μm). In entrambi i casi la marcatura è localizzata sull'intina.

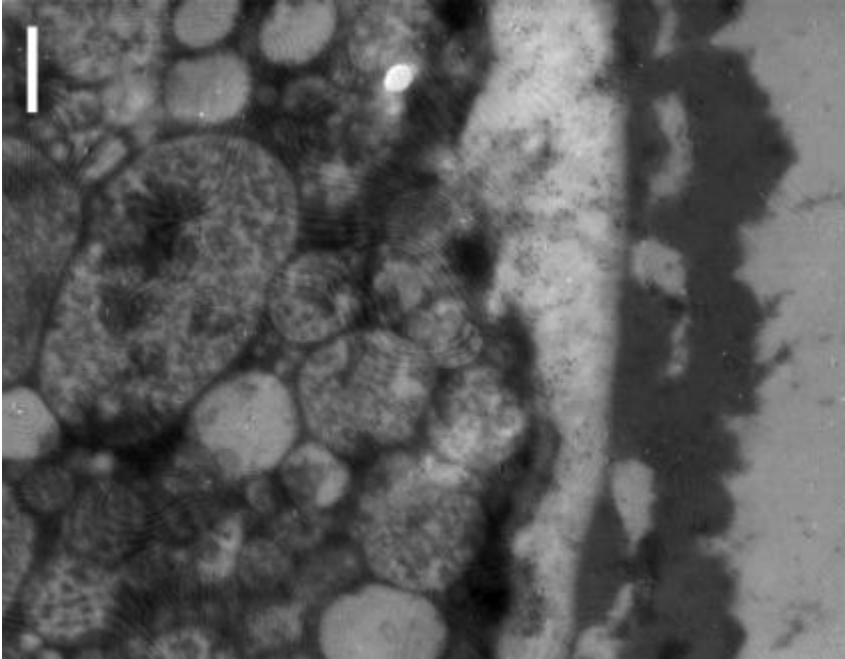


Fig. 32: Risultato dell'immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di leccio processati mediante freeze-substitution e inclusione in resina acrilica. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico D. La marcatura è localizzata sull'intina. Bar = 1 μm .

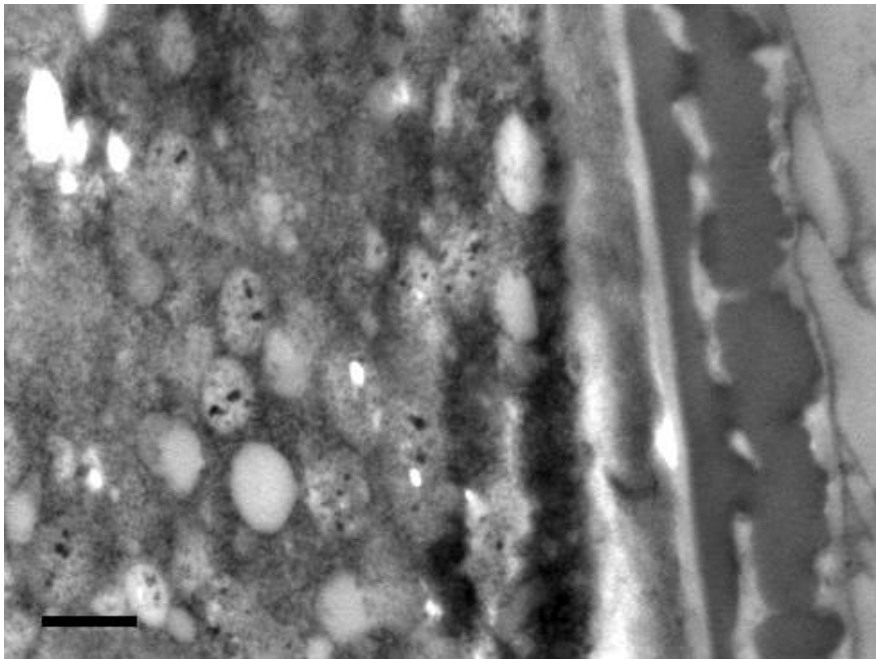


Fig. 33: Controllo dell'esperimento nel quale è presente una bassa marcatura aspecifica di cui si è tenuto conto nella quantificazione. Bar = 1 μ m.

Per un confronto sulla organizzazione subcellulare del polline di leccio sono state condotte osservazioni anche sul polline di *Quercus robur*, farnia, trattato in modo simile.

I risultati hanno messo in evidenza che in farnia l'esina presentava interruzioni a livello del *tectum*, lo strato basale era sottile, l'intina aveva struttura spessa e omogenea (Figura 34). Il citoplasma risultava particolarmente ricco di grosse vescicole elettroneopache di varie dimensioni, contenenti materiale granuloso, talora fuse tra loro. Erano presenti accumuli di amido (Figura 35).

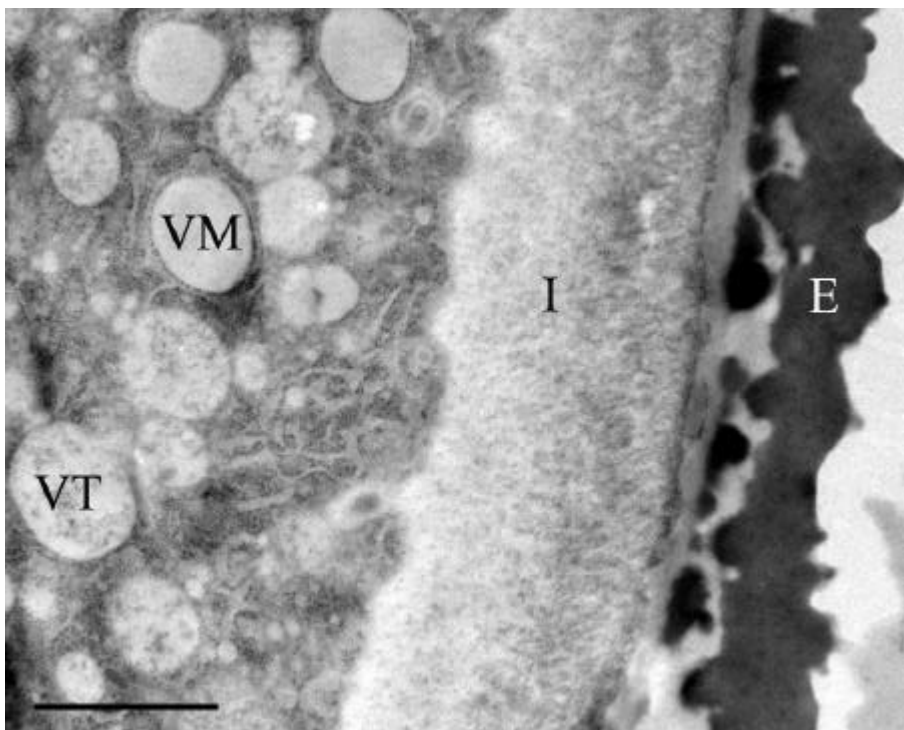
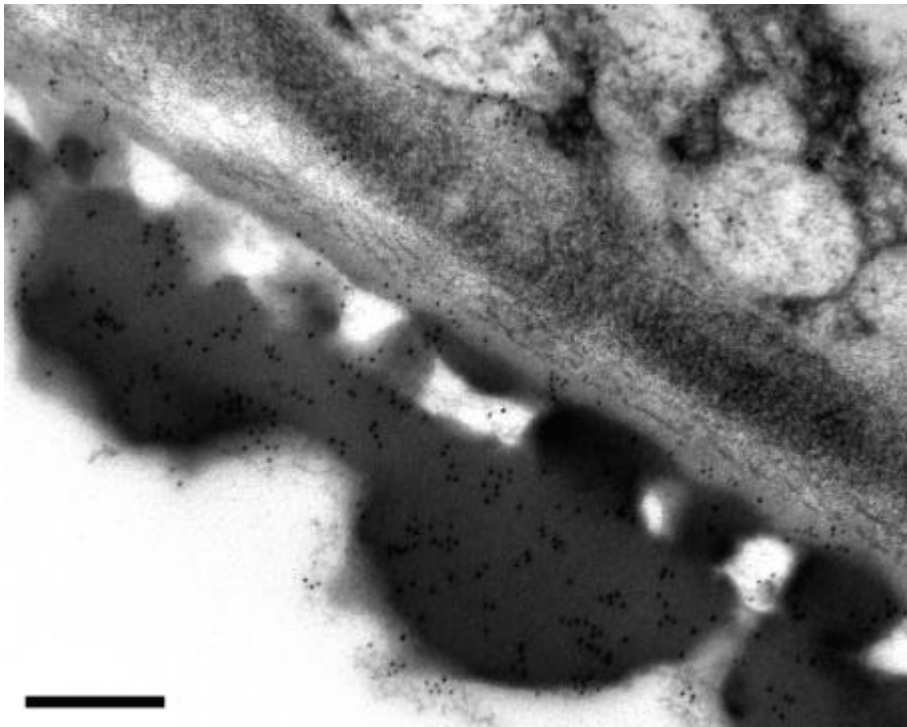


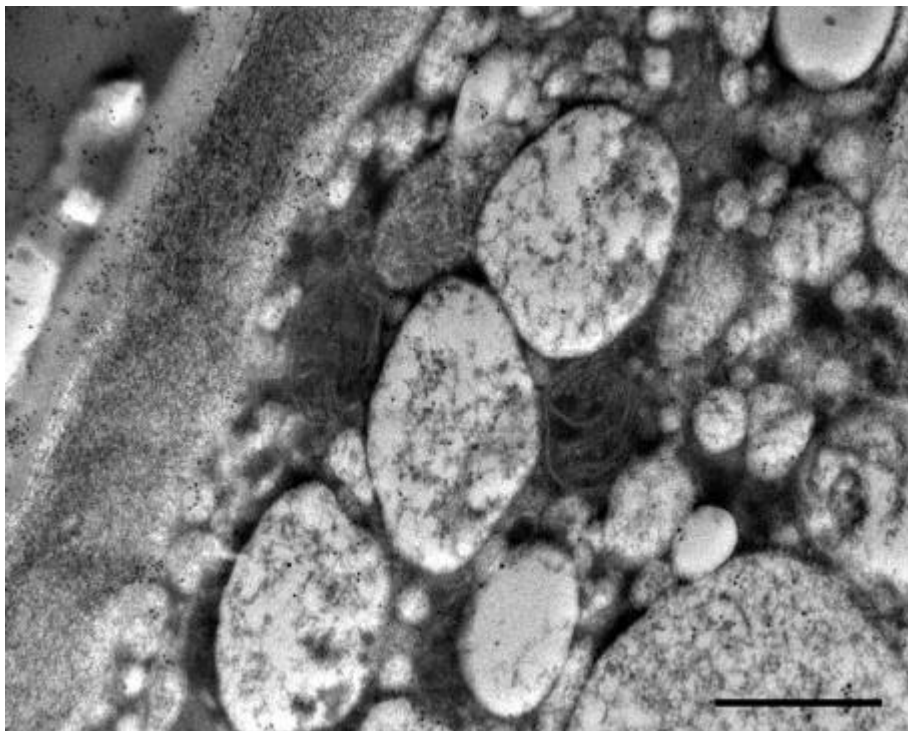
Fig 34: Sezione ultrasottile di polline di farnia. E' visibile l'esina irregolare (E), l'intina spessa e omogenea (I), vescicole citoplasmatiche ricoperte di membrana (VM) e vescicole elettroneopache (VT). Bar = 1 μ m.

La Figura 36 mostra sezioni ultrasottili di polline di farnia (*Quercus robur* L.), fissate mediante freeze-substitution e incluse in resina acrilica, dopo immuno-oro marcatura. L'anticorpo primario usato era costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico B.

65



a



b

Fig. 36: Immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di farnia (*Quercus robur* L.) dopo freeze-substitution e inclusione in resina acrilica. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico B. (a) Particolare della parete del polline (Bar = 1 μ m). (b) Citoplasma (Bar = 1 μ m).

Gli esperimenti di immuno-oro marcatura condotti sulle sezioni di polline di farnia con le IgE purificate dai sieri dei soggetti A, C e D hanno prodotto risultati molto simili a quelli mostrati per il siero del soggetto B: intensa marcatura sull'esina, minore marcatura sull'intina, marcatura quasi assente dal citoplasma. I risultati di tali esperimenti sono riportati nelle Figure che seguono; nella figura 40 è riportato il controllo dell'esperimento nel quale è presente una bassa marcatura aspecifica di cui si è tenuto conto nella quantificazione.

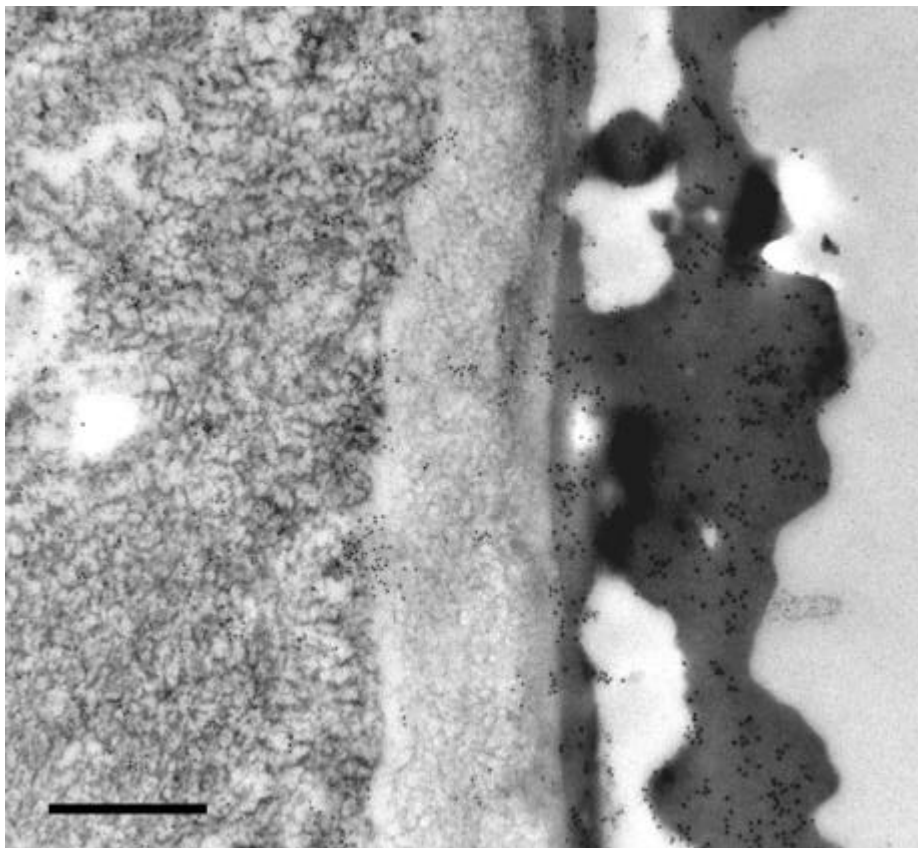
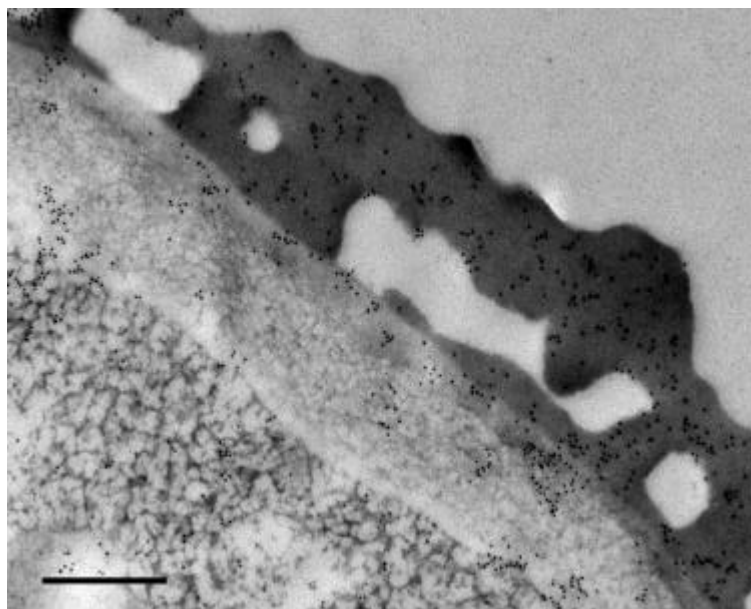
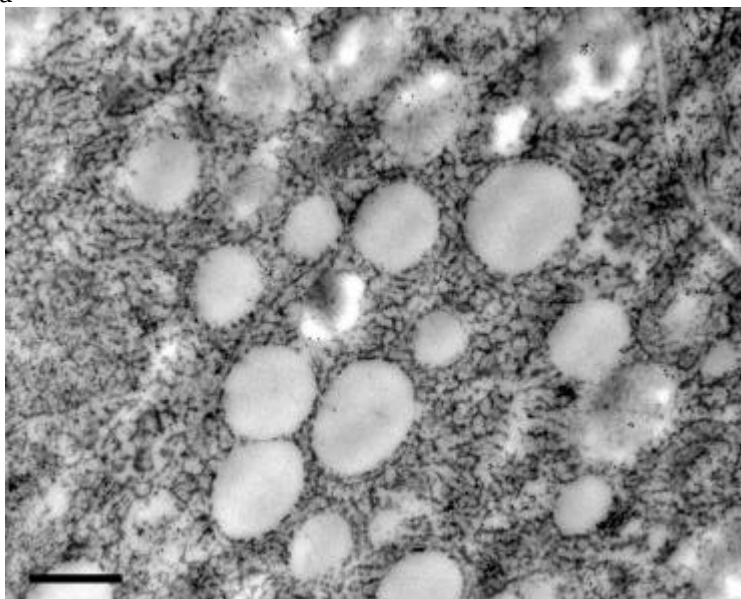


Fig. 37: Immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di farnia. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico A. Bar = 1 μ m



a



b

Fig. 38: Immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di farnia. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico C. (a) Particolare della parete del polline, bar = 1 μ m; (b) Citoplasma, bar = 0.5 μ m.

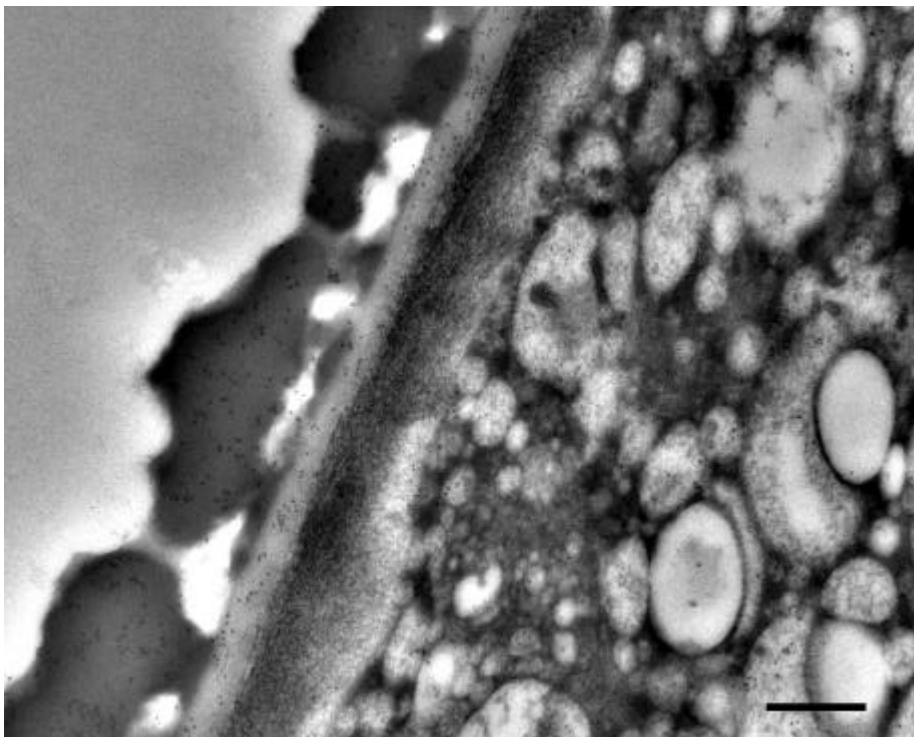


Fig. 39: Immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di farnia. L'anticorpo primario usato è costituito dalla frazione di IgE separata dal siero del soggetto allergico D. Bar = 1 μ m

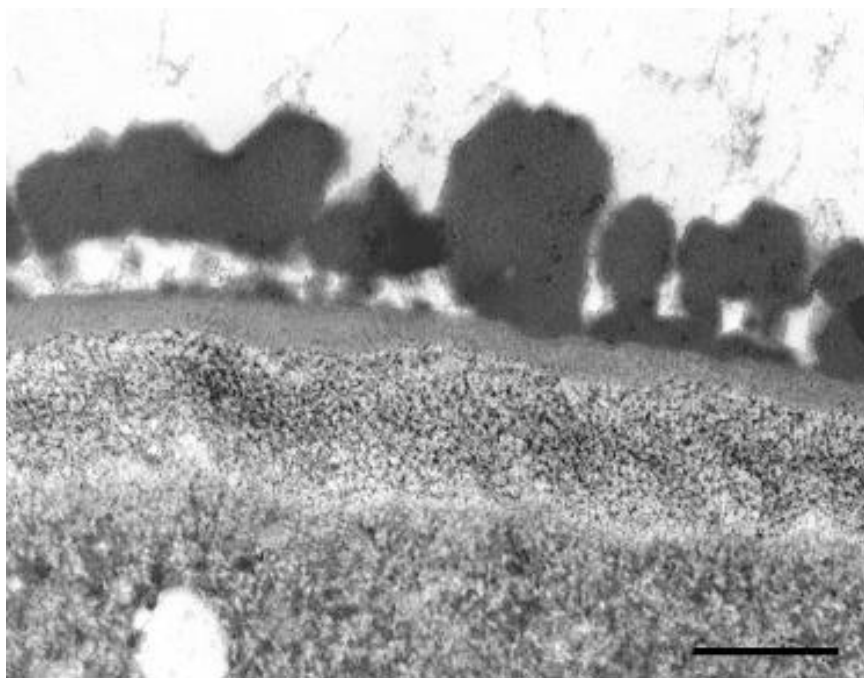


Fig. 40: Immuno-oro marcatura su sezioni ultrasottili di polline di farnia. Controllo senza il siero, sono visibili poche particelle d'oro relative a una reazione aspecifica, delle quali si è tenuto conto nella quantificazione della marcatura presente sui campioni. Bar = 1 μ m.

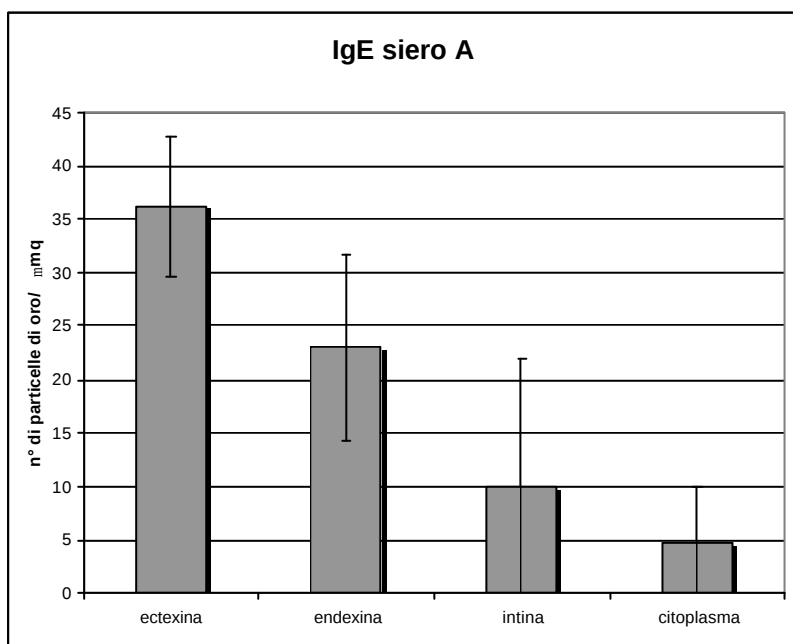
I dati sulla quantificazione della marcatura per le sezioni di polline di farnia processate utilizzando come anticorpo primario i quattro sieri utilizzati in comparti diversi del granulo pollinico sono riportati nella tabella 5.

I valori ottenuti indicano come la marcatura fosse presente in maniera consistente sulla parte esterna dell'esina (ectexina) per tutti i campioni utilizzati, e in misura minore sulla sua parte interna (endexina). Una discreta quantità di marcatura era presente anche sull'intina sebbene si siano ottenuti elevati valori di deviazione standard. Scarsa marcatura è stata osservata nel citoplasma e anche in questo caso i valori di deviazione standard ottenuti risultavano molto alti.

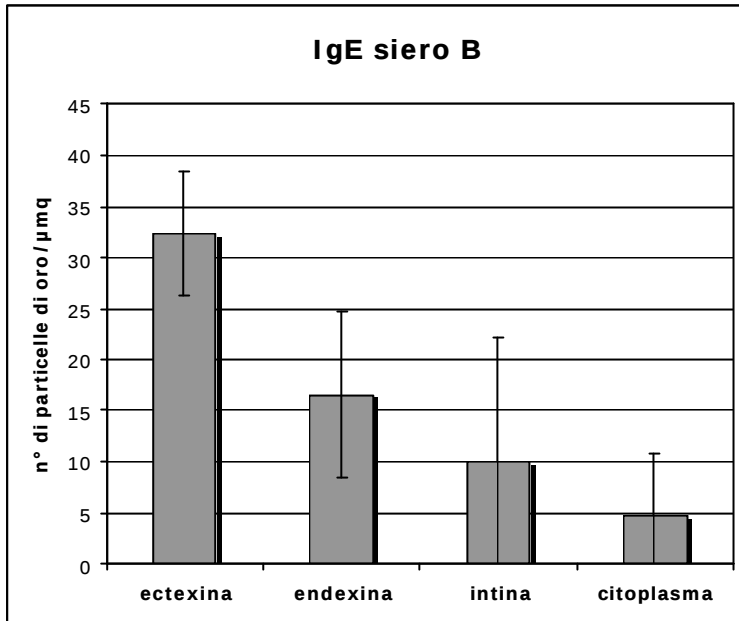
IgE	ectexina	endexina	intina	citoplasma
A	36.20 ± 6.55	23.04 ± 8.74	10.00 ± 11.98	4.60 ± 5.40
B	32.38 ± 6.02	16.54 ± 8.10	10.10 ± 12.05	4.80 ± 5.98
C	38.20 ± 7.88	23.73 ± 9.01	18.83 ± 20.77	8.33 ± 9.89
D	51.38 ± 10.94	24.30 ± 10.05	20.80 ± 22.54	7.60 ± 12.05

Tab. 5: Quantificazione della marcatura secondo il metodo di Taylor *et al.*, 1994, su sezioni di polline di farnia, nei vari compartimenti del granulo pollinico. I valori si riferiscono al numero di particelle d'oro per μm^2 .

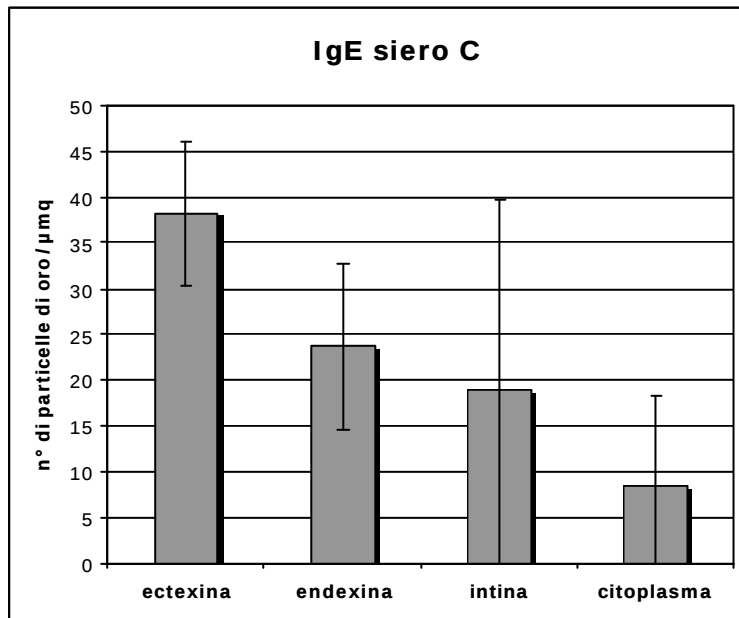
Anche nella Figura 41 sono riportati i dati risultanti dalla quantificazione della marcatura per i sieri del paziente A (Fig 41 a), del paziente B (Fig 41 b), del paziente C (Fig 41 c), e del paziente D (Fig 41 d).



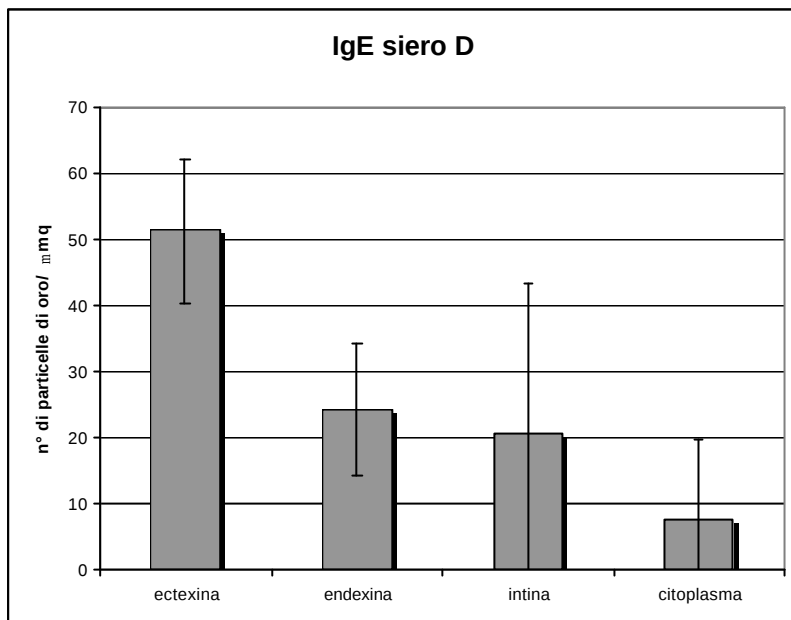
a



b



c



d

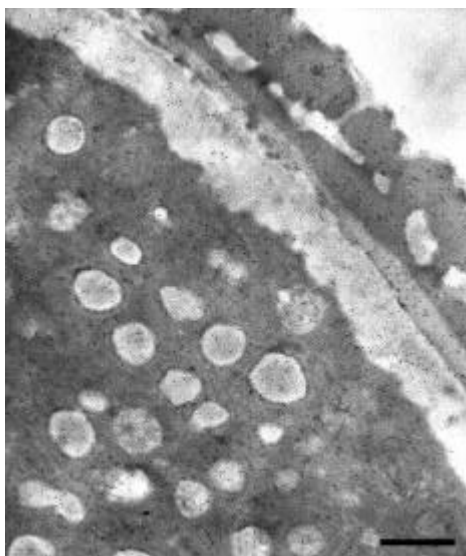
Fig 41: Quantificazione della marcatura secondo il metodo di Taylor *et al.*, 1994, su sezioni di polline di farnia.

Cross-reattività tra pollini di piante diverse.

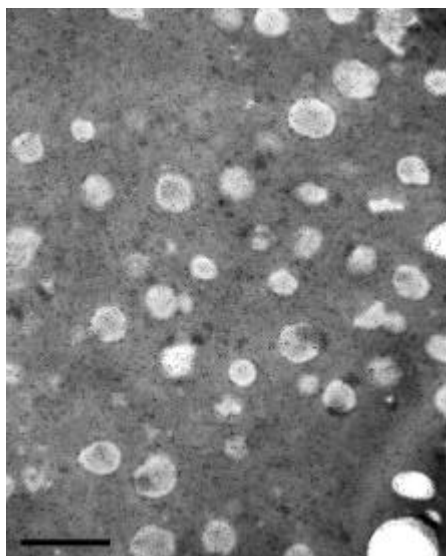
Per una verifica della cross-reattività fra proteine del polline di Fagaceae e sieri di soggetti allergici a polline di piante sistematicamente e filogeneticamente molto lontane sono stati effettuati esperimenti di immunoro-marcatura su sezioni ultrasottili di polline di leccio, faggio e castagno utilizzando le IgE purificate dal siero di un soggetto allergico al polline di Cupressaceae.

I campioni di polline sono stati processati con fissazione in glutaraldeide e inclusione in resina epossidica.

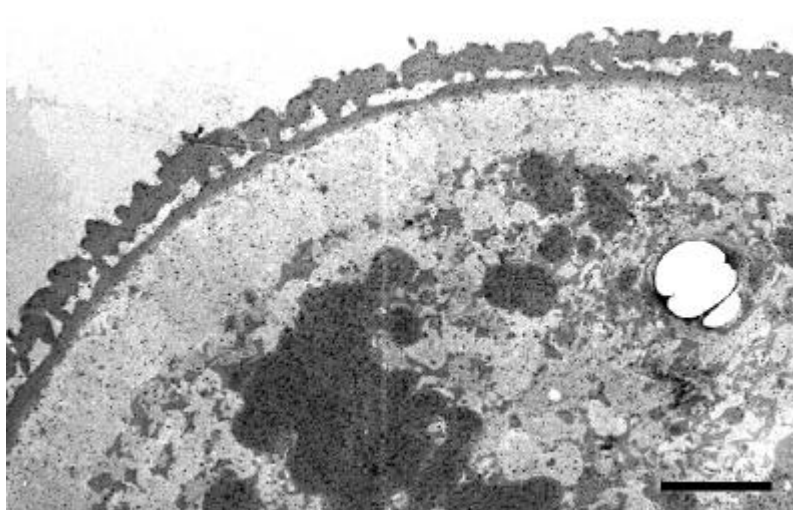
Le figure 42 mostrano che le particelle d'oro erano disperse sull'intera superficie dei granuli delle tre specie, sia sulla parete sia nel citoplasma.



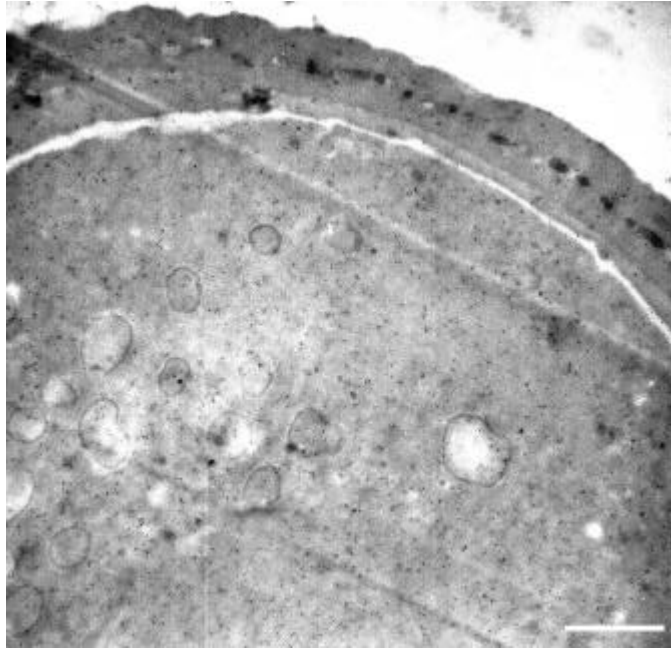
a



b



c



d

Figura 42 sezioni ultrasottili di polline incluso in resina epossidica e marcato con IgE purificate dal siero di un soggetto allergico al polline di *Cupressus arizonica*. a: leccio, parete e citoplasma (Bar = 1 μ m); b: leccio, particolare del citoplasma (Bar = 1 μ m); c: faggio (Bar = 2,5 μ m); d: castagno (Bar = 1,2 μ m). La marcatura è visibile su tutta la superficie dei granuli.

Discussione

I dati ottenuti in sei anni di monitoraggio pollinico continuativo presso l'Università di Roma "Tor Vergata" mostrano come la concentrazione totale di polline campionata annualmente vari negli anni, e segua cicli alternati di massimi e minimi sui quali si ritiene che possano influire la quantità di precipitazioni dell'anno precedente la stagione di pollinazione (Fairley e Batchelder, 1986). In ciascun anno di campionamento la maggior quantità di polline è prodotta dalla famiglia delle Cupressaceae, seguita dalla famiglia delle Fagaceae, che nel 2001 ha raggiunto valori massimi superando addirittura la produzione delle Cupressaceae (10145 granuli/m³ rispetto ai 9909 delle Cupressaceae) (Travaglini *et al.*, 2002a, 2002b).

Per il solo genere *Quercus* si registrano concentrazioni di polline annue (registrate in aprile e maggio) confrontabili con quelle prodotte dall'intera famiglia delle Gramineae, alla quale appartengono numerosissimi generi e specie di piante spontanee che fioriscono sequenzialmente da fine marzo ad agosto inoltrato (Travaglini *et al.*, 2002a).

Il confronto tra lo spettro pollinico e quello antesico indica la sovrapposizione della presenza di polline nell'aria alla fioritura, e questo è anche in accordo con la elevata presenza di piante di leccio nell'area di Roma e nelle zone limitrofe.

All'intera famiglia delle Fagaceae e in particolare al genere *Quercus* appartengono pertanto piante di grande importanza dal punto di vista aerobiologico, che producono grandi quantità di polline concentrate in periodi dell'anno da aprile a fine maggio.

Poiché una delle condizioni del polline per causare malattie allergiche è la sua presenza nell'aria in elevate concentrazioni, tali da determinare alte probabilità di contatto con le mucose dei soggetti allergici (Knox e Suphioglu, 1996), ne segue che il polline delle Fagaceae e in particolare quello delle querce può essere causa di sensibilizzazioni e di crisi allergiche.

I risultati dell'analisi dei questionari ben si accordano con i dati riportati nella letteratura sulla diffusione e prevalenza delle allergie per l'Italia e in particolare il centro della penisola.

La prevalenza delle singole pollinosi è in accordo con il dato riportato da Troise (2001) per il bacino del Mediterraneo. Secondo Troise, su un campione di soggetti con diagnosi di allergia a polline, la prevalenza di allergia a polline di Gramineae in Italia centrale è del 65%, il 37% per il polline di *Parietaria* e il 16% per il polline di olivo.

I dati ricavati dai questionari compilati indicano che il polline di Gramineae è il responsabile del maggior numero di sensibilizzazioni (71% dei soggetti con allergia a polline), seguito dal polline di *Parietaria* (32%) e di olivo (20%) (Grilli Caiola *et al.*, 2002, Mazzitelli *et al.*, dato alle stampe).

Solo il 4% dei soggetti allergici aveva dichiarato nel questionario di essere sensibile al polline di Fagaceae, sebbene dopo anamnesi e analisi cliniche del campione scelto nel primo anno di indagine, ben il 19% dei soggetti allergici risultava positivo al Prick Test effettuato con il mix dell'estratto pollinico di Fagaceae, comprendente l'estratto di polline di *Fagus sylvatica*, *Castanea sativa* e *Quercus alba*. Tale dato è maggiore rispetto a quello indicato nella letteratura (Subiza *et al.*, 1995) per un campione di soggetti allergici a Madrid, di cui il 14% risulta positivo al polline di leccio, ed è molto maggiore rispetto al dato di prevalenza riportato per Mérida (sud ovest della Spagna) indicato come 3-5% dei soggetti allergici e nessuna monosensibilizzazione (Prados *et al.*, 1995) e per Montpellier (Sud della Francia) indicato come 6-8% dei soggetti allergici (Bousquet *et al.*, 1984).

Da ciò si evince che le pollinosi causate dal polline di Fagaceae sono diffuse ma probabilmente sottovalutate, non riconosciute o confuse con altri tipi di patologie.

In accordo con la letteratura esistente sono stati messi a punto esperimenti per determinare la presenza di proteine nel polline di leccio che reagissero con il siero di soggetti risultati sensibili al polline delle Fagaceae.

Il primo protocollo utilizzato per l'estrazione proteica da polline (Jarolim *et al.*, 1989) prevedeva passaggi di dialisi per diminuire la concentrazione del tampone di estrazione, che poteva interferire con la corsa elettroforetica.

Seguendo tale protocollo, dopo il trasferimento dell'estratto su nitrocellulosa e l'immunoprecipitazione con i sieri dei soggetti allergici alle Fagaceae, veniva riconosciuta una sola banda dai sieri dei soggetti C e D, mentre i sieri dei soggetti A e B non sembravano riconoscere nessuna banda.

La banda riconosciuta corrispondeva a una proteina dal peso molecolare di circa 9,5 kDa. La stessa banda veniva riconosciuta mediante l'utilizzo di due diversi anticorpi secondari: il radiomarcato coniugato con I₁₂₅ e l'anticorpo coniugato con perossidasi.

Tale proteina è stata quindi isolata, trasferita su membrana di PVDF e sequenziata. Il paragone della sequenza ottenuta con sequenze di proteine conosciute ha rivelato che la proteina isolata era l'ubiquitina.

Tale dato ha fatto escludere la possibilità che la proteina isolata fosse quella allergenica, proprio per le caratteristiche dell'ubiquitina, proteina ubiquitaria presente in tutte le cellule eucariotiche, molto conservata durante l'evoluzione.

Nonostante questo, il procedimento utilizzato per l'isolamento e il sequenziamento ha permesso l'identificazione di 18 amminoacidi N-terminali. Tale sequenza è abbastanza lunga per effettuare una ricerca nelle banche dati di sequenza e per essere paragonata a sequenze di proteine note.

Lo stesso procedimento pertanto potrà essere utilizzato per sequenziare altre bande corrispondenti a proteine allergeniche, allo scopo di identificarne la sequenza e comprendere la funzione che svolgono nel polline.

Nelle prove successive per identificare le proteine allergeniche del polline di leccio è stato escluso dal protocollo di estrazione proteica il passaggio di dialisi. La membrana usata per la dialisi aveva un "cut-off" di 3500 Da, quindi avrebbe dovuto trattenere tutte le proteine di peso molecolare superiore; nonostante questo nell'estratto proteico non dializzato comparivano molte più bande a pesi molecolari maggiori di 3500 Da, quindi evidentemente il passaggio di dialisi comportava la perdita di una grande quantità di proteine anche ad alti pesi molecolari. Probabilmente tali proteine restavano intrappolate nelle maglie della membrana e non erano più recuperabili. La perdita era anche confermata dai valori ottenuti dai dosaggi proteici degli estratti, valori molto più bassi nell'estratto dializzato rispetto a quello non dializzato.

L'estratto non dializzato non subiva modifiche nella corsa elettroforetica, quindi evidentemente i sali presenti nella soluzione non interferivano in maniera vistosa con il processo di separazione.

Sono stati quindi sottoposti nuovamente a SDS-PAGE e western blotting gli estratti proteici non dializzati, e la reattività dei sieri dei soggetti allergici è stata valutata nuovamente.

Gli esperimenti di immunoprecipitazione dopo elettroforesi in condizioni denaturanti mostrano che i sieri dei soggetti allergici al mix di polline di Fagaceae riconoscono molte bande sull'estratto proteico non dializzato del polline di leccio. Ciò ha fatto ritenere che l'estratto del polline di leccio contenga diverse frazioni proteiche potenzialmente allergeniche.

Il comportamento dei sieri dei soggetti allergici nei confronti dell'estratto proteico trova riscontro con quanto riportato nella letteratura (e.g. Loria *et al.*, 1989). Dal momento che le IgE presenti nel siero sono policlonali, esse

riconoscono più epitopi proteici o glucidici, quindi si legano ad un gran numero di proteine.

Tuttavia, facendo reagire con l'estratto proteico di un dato polline un numero maggiore di sieri, le proteine che vengono riconosciute dalla maggior parte di essi risultano essere allergeni maggiori di tale polline, ovvero allergeni che determinano la maggior parte delle sensibilizzazioni nei soggetti allergici a quel polline (Negrini, 1992).

Nel caso del polline di leccio, nonostante l'esperimento di western blotting abbia rivelato la presenza di molte proteine che reagiscono con le IgE dei soggetti ad esso sensibili, due bande sono ricorrenti e riconosciute da tutti e quattro i sieri utilizzati.

Tali bande hanno peso molecolare di circa 28 e 36 kDa

Sebbene i sieri utilizzati non siano in numero sufficiente per affermarlo con certezza, i dati preliminari inducono a ipotizzare che le due bande corrispondano agli allergeni maggiori del polline di leccio (Mazzitelli *et al.*, 2004).

Non viene più riconosciuta la proteina di 9,5 kDa inizialmente identificata come ubiquitina, probabilmente perchè la reattività dei sieri verso le nuove proteine è maggiore e la reazione di colorazione viene bloccata prima che si colori anche la banda a 9,5 kDa.

Inoltre non viene riconosciuta nessuna banda di circa 17 kDa, peso molecolare degli allergeni del polline di *Quercus alba* e delle altre Fagales (betulla, ontano, nocciolo, carpini) (Ipsen e Hansen, 1991), né di 22 kDa, peso molecolare dell'allergene del polline di *Castanea sativa* (Kos *et al.*, 1993). Si tratta quindi di proteine allergeniche nuove e diverse dalla famiglia delle proteine PR a cui appartengono gli allergeni delle piante filogeneticamente vicine al leccio.

L'esperimento di western blotting condotto con l'estratto proteico delle foglie del leccio indica che le proteine allergeniche di tale pianta sono espresse in maniera esclusiva nel polline e non negli altri tessuti.

Il saggio ELISA ha confermato che tutti e cinque i sieri dei soggetti allergici selezionati reagiscono con l'estratto proteico del polline di leccio, sebbene in misura differente l'uno dall'altro. Questo risultato stabilisce in modo univoco che i soggetti che hanno partecipato alla ricerca sono sensibili al polline di leccio, sebbene nell'estratto proteico con cui era stato effettuato loro il "Prick Test" il polline di leccio non fosse compreso. L'estratto comprendeva infatti polline di castagno, di faggio e di *Quercus alba*.

Inoltre il saggio ELISA condotto con le proteine del polline di castagno e di faggio conferma l'esistenza di cross-reattività tra le varie specie di Fagaceae (Mazzitelli e Grilli Caiola, 2003b).

Il saggio ELISA con deglicosilazione che utilizza il sodio periodato per eliminare le catene laterali glucidiche dalle proteine, ha mostrato che, con l'uso del siero di quattro soggetti (A, C, D ed E) il trattamento col sodio periodato determina una diminuzione della reattività rispetto al campione non trattato e rispetto al campione trattato con le condizioni standard. Con l'uso del siero del paziente B, invece, la reattività dei campioni trattati con sodio periodato e non trattati è confrontabile.

Indicando come "proteici" gli epitopi periodato resistenti, e come "glucidici" gli epitopi periodato sensibili (Iacovacci *et al.*, 2001), i valori ottenuti indicano che le proteine allergeniche del polline di leccio hanno sicuramente epitopi proteici di legame alle IgE.

La riduzione della reattività che si osserva nei campioni trattati con sodio periodato potrebbe essere dovuta alla presenza di epitopi di natura glucidica di legame alle IgE. Il sodio periodato, tuttavia, ha anche un'azione ossidante sulle molecole proteiche, quindi la diminuzione di reattività potrebbe essere dovuta in parte a un effetto di degradazione degli epitopi di legame.

L'effetto del sodio periodato su allergeni che hanno epitopi di legame alle IgE esclusivamente di natura glucidica, però, è quello di annullare completamente la reattività tra estratto proteico e siero (Barletta *et al.*, 1998), come succede nel caso dell'allergene maggiore del *Cupressus arizonica* Greene, Cup a 1, il quale presenta un solo epitopo di legame che è di natura glucidica (Iacovacci *et al.*, 2001).

La diminuzione di reattività che si osserva nel caso del polline di leccio, ma la non totale scomparsa di reattività, rafforza la deduzione dell'esistenza di epitopi proteici di legame alle IgE, e suggerisce che potrebbero esistere anche epitopi di legame di natura glucidica.

Poiché le catene di carboidrati legati alle proteine sono abbastanza conservati, e i sieri utilizzati appartengono a soggetti polisensibili, la presenza di epitopi di natura proteica è di importanza fondamentale per la caratterizzazione delle molecole allergeniche studiate.

Per questo motivo gli esperimenti di immuno-oro marcatura al TEM sono stati condotti inizialmente con le IgE purificate dal siero del paziente B, che legano sicuramente porzioni proteiche delle molecole allergeniche, e successivamente, per confronto, con le IgE purificate dai sieri degli altri pazienti.

Le colorazioni citochimiche sul polline di leccio hanno evidenziato la presenza di inclusi lipidici aggregati e confermato l'assenza di amido come già era noto dalla letteratura esistente (Franchi *et al.* 1996), sebbene la colorazione con Thiery (1967) abbia rivelato la presenza di polisaccaridi complessi. La colorazione con Blu di Toluidina (Carraro *et al.*, 1979) ha confermato la presenza di poco materiale proteico, fornendo anche una spiegazione alle difficoltà incontrate nell'estrazione proteica.

Allo scopo di indagare sull'ultrastruttura del polline studiato e valutare la localizzazione delle molecole allergeniche già identificate dal punto di vista biochimico, sono stati seguiti due protocolli diversi per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione: il procedimento convenzionale, che consiste in fissazione del polline in glutaraldeide diluita in un tampone acquoso, seguita da inclusione in resina epossidica, e la freeze-substitution che prevede una fissazione rapida a freddo seguita da inclusione in resina acrilica.

Questi due protocolli sono stati applicati al polline di leccio, e per confronto anche al polline di farnia, pianta appartenente allo stesso genere del leccio (*Quercus*).

La fissazione in glutaraldeide in tampone cacodilato e l'inclusione in resina epossidica hanno evidenziato che la parete del polline di leccio è alquanto spessa, l'esina appare scabrata (Punt *et al.*, 1994) con microperforazioni (Ciampolini e Cresti, 1981) e con scarsi spazi intercolonnari, e si assottiglia in corrispondenza delle aperture; l'intina è spessa e fibrillare. Una così robusta parete, anche in corrispondenza dei colpi, può spiegare la bassa quantità di proteine estratte dal polline di leccio, quantità estremamente bassa rispetto a quelle estratte dalle foglie della stessa pianta.

La tecnica descritta, inoltre, necessita di un passaggio di post-fissazione in tetrossido d'osmio, il quale determina una prima colorazione del preparato creando un contrasto sulle strutture membranose e quindi ne permette una migliore osservazione al microscopio elettronico (Martinez e Wick, 1991), ma allo stesso tempo potrebbe interferire con la tecnica dell'immuno-oro marcatura perché l'osmio potrebbe ridurre o mascherare l'antigenicità delle molecole, quindi potrebbe portare ad una alterazione dei risultati (Bullock, 1984).

Infatti gli esperimenti di immuno-oro marcatura su sezioni di polline così processato hanno rivelato la presenza di molecole allergeniche, ma non sono risultati adeguati per stabilirne la corretta localizzazione.

Sulle sezioni di polline di leccio marcate con IgE purificate dal siero dei soggetti allergici al polline di Fagaceae è evidente una estesa marcatura, diffusa su tutta la superficie dei granuli, sia sulla parete sia nel citoplasma e nel nucleo. Utilizzando le IgE dei diversi soggetti si ottiene lo stesso tipo di marcatura. Tali risultati rivelano la presenza di molecole allergeniche che vengono riconosciute dalle IgE dei soggetti allergici, ma la così estesa localizzazione della marcatura suggerisce uno spostamento di tali molecole dovuto probabilmente al protocollo seguito per la preparazione dei campioni.

La glutaraldeide usata per la fissazione, infatti, è diluita in tampone cacodilato, un tampone acquoso, e il contatto di tale soluzione con il polline fresco potrebbe determinare lo spostamento delle molecole idrosolubili o addirittura la loro diffusione dal granulo prima che le strutture siano fissate e rese quindi immobili dal fissativo (Grote, 1992).

Lo stesso tipo di risultato si è ottenuto conducendo esperimenti di immuno-oro marcatura su sezioni di polline di castagno e di faggio, inclusi in resina epossidica. Tali esperimenti rivelano la presenza di molecole allergeniche ma non ne indica la corretta localizzazione. Tuttavia la loro presenza indica l'esistenza di cross-reattività tra i diversi pollini studiati.

La tecnica della fissazione a freddo e inclusione in resina acrilica consente una buona conservazione dell'ultrastruttura del polline. La parete del granulo appare ben conservata, meglio che nel caso della preparazione convenzionale, gli organelli citoplasmatici ben definiti e con membrane intatte. Questa metodica sembra essere migliore per il corretto mantenimento dell'ultrastruttura dei granuli pollinici (Martinez e Wick, 1991), inoltre non prevede il passaggio di post fissazione, necessario invece nella preparazione convenzionale, quindi consente di procedere con gli esperimenti di immuno-oro marcatura evitando le possibili alterazioni dei risultati dovuti all'uso del tetrossido d'osmio.

Tuttavia nel caso del polline di leccio la fissazione a freddo e l'inclusione in resina acrilica hanno comportato delle difficoltà, è stata infatti eseguita nel maggio 2003 e ripetuta nel maggio 2004, ma in entrambi i casi i risultati sono stati di qualità inferiore, per quel che riguarda la possibilità di eseguire ulteriori analisi, rispetto a quelli ottenuti con il polline di farnia.

I granuli di polline di leccio inclusi in maniera corretta sono risultati la minoranza, ed è stato difficile ottenere delle buone sezioni ultrasottili. Tali

preparati sono stati sottoposti ugualmente a immuno-oro marcatura. Si sono ottenute poche sezioni, non adeguate ad una valutazione quantitativa della marcatura, sebbene sia risultato possibile valutare qualitativamente la localizzazione degli allergeni.

I risultati della immuno-oro marcatura su polline di leccio trattato con freeze substitution hanno dato risultati diversi rispetto a quelli ottenuti mediante inclusione convenzionale, indicando che esiste una localizzazione precisa delle molecole allergeniche e queste non risultano presenti in tutti i compartimenti del granulo pollinico. Tale tecnica è quindi da preferire a quella convenzionale.

Nonostante la difficoltà incontrata nell'ottenere delle buone sezioni di polline di leccio su cui effettuare la localizzazione degli allergeni, è stato possibile determinare che la marcatura è localizzata esclusivamente sull'intina e in misura minore nel citoplasma del polline di leccio, e in particolare in vescicole elettrone trasparenti. Tali strutture potrebbero essere sedi di lipidi o di carboidrati solubili quali il saccarosio, ma non di amido, in quanto la colorazione citochimica effettuata con il reattivo di Lugol (Pearce, 1985) indica l'assenza di questo tipo di riserva, sebbene con il metodo di Thiery (1967) sia stata messa in evidenza la presenza di polisaccaridi complessi. L'assenza di amido nel polline di leccio è stata evidenziata anche Franchi *et al.* (1996).

La marcatura manca completamente sull'esina.

Utilizzando le IgE purificate dal siero dei soggetti A, B, C e D si ottiene la stessa localizzazione della marcatura.

Una marcatura così localizzata suggerisce anche che la funzione delle molecole allergeniche potrebbe essere legata a fasi successive dell'impollinazione, come la degradazione della parete dello stimma, la produzione del tubetto pollinico o il suo allungamento.

A differenza del leccio il polline di farnia processato mediante freeze-substitution è risultato incluso in maniera corretta e le sezioni ultrasottili ottenute erano buone e ricche di granuli. L'immuno-oro marcatura su tali preparati ha evidenziato che le molecole allergeniche sono localizzate quasi esclusivamente sulla parete del granulo (esina e intina), ed in particolare sulla parte esterna dell'esina (ectexina), e risultano assenti dal citoplasma. Qui infatti sono presenti pochi aggregati di particelle d'oro in organelli citoplasmatici elettrone trasparenti, ma la maggior parte della marcatura è

localizzata sulla parete dei granuli. Utilizzando le IgE dei diversi soggetti allergici si ottengono risultati molto simili.

Una marcatura così localizzata esclusivamente sulla superficie esterna del granulo suggerisce che la funzione delle molecole allergeniche sia legata alle prime fasi dell'interazione tra polline e stimma o ai meccanismi di riconoscimento specie-specifico.

La quantificazione della marcatura è stata possibile solo nel caso del polline di farnia, perchè nel caso del leccio non si sono ottenute sezioni sufficienti.

I dati sulla quantificazione delle particelle d'oro nei diversi comparti del granulo pollinico di farnia, per le IgE purificate dai quattro sieri utilizzati, indicano come la marcatura sia presente in maniera consistente sulla parte esterna dell'esina (ectexina) e in misura minore sulla sua parte interna (endexina). Una discreta quantità di marcatura è presente anche sull'intina, ma gli alti valori di deviazione standard ottenuti indicano che tale marcatura non è diffusa in modo omogeneo. Poca marcatura è osservata nel citoplasma, e i valori di deviazione standard ottenuti indicano che anche in questo caso la marcatura non è diffusa in modo omogeneo, ma è concentrata in pochi aggregati di particelle d'oro in piccole zone del citoplasma, rispetto a zone molto ampie dove la marcatura è completamente assente.

Tale localizzazione, risulta molto diversa da quella riscontrata nel polline di leccio, e conferma l'ipotesi che le molecole allergeniche del leccio siano di tipo diverso da quelle localizzate nel polline di farnia e da quelle note nel polline delle altre specie appartenenti all'ordine delle Fagales. Questi allergeni infatti hanno struttura, sequenza e funzione simile, appartengono alla famiglia delle proteine PR (Hoffmann-Sommergruber, 2000), e sono localizzati sulla superficie esterna del granulo pollinico (Knox e Suphioglu, 1996).

Dalla letteratura è noto che il polline delle piante appartenenti all'ordine delle Fagales determina fenomeni di cross-reattività. Il polline che risulta il principale responsabile di manifestazioni allergiche è quello della betulla, che determina circa il 43% delle pollinosi in nord Europa (Varela *et al.*, 2003), dove la pianta è molto diffusa (Niederberg *et al.*, 1998). I soggetti sensibili al polline di piante arboree risultano sensibilizzati in primo luogo al polline di betulla, e in misura minore al polline delle altre Fagales, perchè gli allergeni del polline di betulla contengono la maggior parte degli epitopi di legame alle IgE presenti nel polline delle altre specie di Fagales (Eriksson *et al.*, 1984).

Nonostante la differenza riscontrata nel peso molecolare e nella localizzazione subcellulare, però, i dati confermano la cross-reattività tra gli allergeni del polline di leccio e quello delle altre Fagaceae studiate, suggerendo che tali molecole condividano epitopi di legame alle IgE di tipo lineare o conformazionale (la cross reattività è valutata tramite saggi ELISA, quindi su proteine in forma nativa).

Gli esperimenti effettuati per determinare la presenza di cross-reattività tra polline di specie diverse indicano che le IgE purificate dal siero di un soggetto allergico al cipresso reagiscono con il polline di leccio, castagno e faggio (Mazzitelli e Grilli Caiola, 2003a).

Sulle sezioni di polline di leccio, castagno e faggio incluse in resina epossidica e marcate con IgE purificate dal siero di un soggetto allergico al polline di *Cupressus arizonica* è evidente una estesa marcatura, diffusa su tutta la superficie dei granuli, sia sulla parete sia nel citoplasma.

La presenza della marcatura indica la presenza, sul polline delle tre Fagaceae esaminate, di molecole allergeniche che vengono riconosciute dal siero del soggetto sensibile al polline di cipresso. Tali molecole sarebbero riconosciute dalle IgE dello stesso soggetto, e questo potrebbe indicare fenomeni di cross-reattività tra i vari tipi pollinici sebbene le due famiglie di piante siano filogeneticamente molto distanti tra loro.

Conclusioni

La ricerca ha mostrato che il polline di leccio è presente nell'aria in elevate concentrazioni durante il mese di maggio, periodo di fioritura della specie, e che la sua presenza è causa di probabili sensibilizzazioni e allergie.

Le allergie respiratorie causate dal polline di leccio sono state finora sottostimate, ma i dati di prevalenza ottenuti in questo lavoro (19% delle pollinosi) raggiungono i valori di prevalenza osservati in Italia per il polline di olivo (20%).

Le molecole allergeniche identificate nel leccio sono espresse nel polline e non nelle foglie, e hanno caratteristiche e diverse da quelle identificate e caratterizzate nel polline delle altre piante appartenenti all'ordine delle Fagales (betulla, ontano, nocciolo, castagno e quercia bianca).

È stato confermato che esiste cross-reattività tra il polline di leccio e quello delle altre specie di Fagaceae studiate (castagno, faggio, farnia).

È stato inoltre applicato il metodo della freeze-substitution, che consente il corretto mantenimento della localizzazione delle molecole allergeniche nel polline. L'applicazione di tale metodo ha permesso di evidenziare che le molecole allergeniche del polline di leccio sono localizzate prevalentemente sullo strato interno della parete (intina), e in misura minore in vescicole elettron-trasparenti nel citoplasma. Tale localizzazione risulta diversa da quella degli allergeni pollinici delle altre Fagales, i quali sono localizzati sulla superficie esterna dei granuli pollinici (esina), come nel caso degli allergeni del polline di farnia la cui localizzazione è stata messa in evidenza in questo lavoro.

Gli allergeni del polline di leccio rappresentano quindi delle proteine con struttura, funzione e localizzazione subcellulare diversa rispetto a quelli della farnia, della quercia bianca e del castagno (allergeni noti di piante appartenenti alla stessa famiglia del leccio) e anche rispetto agli allergeni delle altre Fagales, ordine di appartenenza del leccio.

Nonostante le molecole allergeniche siano diverse, però, esiste cross-reattività tra le specie, quindi si può ipotizzare la presenza di epitopi di legame alle IgE comuni, o epitopi conformazionali simili.

Studi di cross-reattività tra polline di Fagaceae e di Cupressaceae hanno dato risultati positivi, indicando che soggetti sensibili al polline di *Cupressus* possono presentare reazioni allergiche anche nei confronti del polline delle Fagaceae. Le allergie da polline di cipresso sono ben identificate, poiché la pianta fiorisce in inverno, e i sintomi allergici in quel periodo sono facilmente attribuiti al suo polline. Il leccio invece fiorisce in primavera,

contemporaneamente ad altre piante il cui polline è notoriamente allergenico, quali Gramineae, *Parietaria*, Olivo, e inoltre non produce monosensibilizzazioni, quindi sintomi allergici dovuti al polline di leccio potrebbero essere mascherati o confusi con altri tipi di pollinosi.

È stato inoltre utilizzato un protocollo che ha permesso l'isolamento e il sequenziamento di una proteina presente nell'estratto proteico del polline di leccio. Tale protocollo ha permesso il sequenziamento di 18 aminoacidi N-terminali della proteina, risultando valido per ottenere una sequenza abbastanza lunga da essere confrontata con le sequenze presenti nelle banche dati delle proteine con struttura e funzione nota.

Sebbene la proteina coinvolta non sia poi risultata essere l'allergene del polline di leccio, il procedimento usato si è dimostrato efficiente e potrà essere utilizzato per ottenere la sequenza delle proteine allergeniche, per valutare la loro somiglianza con allergeni pollinici già conosciuti e anche per chiarire il loro ruolo nella biologia della pianta.

Summary

The long experience in pollen monitoring in the area of the University of Tor Vergata made by the Aerobiological Monitoring Center of the Campus (Travaglini *et al.* 2000, 2002) let us discover that the genus *Quercus* pollen is between 7 and 15% of the total pollen per annum, to be compared, e.g., with 10-15% of the pollen of the whole Oleaceae family, which is very well studied for its high allergenic activity (e.g. Martin-Orozco *et al.*, 1994). Consequently, it is important to begin to exploit the problem of the possible allergenic properties of this pollen.

The procedure of study (Knox *et al.*, 1998) is to collect the sera of allergic subjects and let it react with the proteic extract of the chosen pollen.

In a previous work we explored whether the Fagaceae pollen could be allergenic by making use of the IgE from a subject allergic to *Cupressus arizonica* pollen. Immunogold labelling experiments revealed the presence of molecules that reacted with IgE on holm oak, chestnut and beech pollen. Even if we did not characterize these molecules, their presence gave us the suspect that those pollens were allergenic (Mazzitelli and Grilli, 2003).

Few informations are present in the literature about the allergenic properties of Fagaceae pollen.

The major allergen of chestnut pollen is already characterized (Kos *et al.*, 1993), it is a 22 kDa protein with great similarity in sequence with the pollen allergens of the species belonging to Fagales order (birch, alder, hornbeam and hazel) (Ipsen & Hansen, 1991). All these proteins were very similar one to each other and belong to the pathogenesis related protein family (Hoffmann-Sommergruber, 2000).

The only species of *Quercus* for which allergenic studies are present in the literature is the north American White oak, *Quercus alba* (Loria *et al.*, 1989), whose major allergen is identified at 17 kDa, is a pathogenesis related protein named Que a 1 (Ipsen & Hansen 1991).

In Italy *Quercus alba* is not spontaneously present.

In particular in Rome, one widespread species is the Holm oak (*Quercus ilex*), which constitutes about 5% of the global trees population of the city (Attorre *et al.* 1999).

In addition, a prick test screening of more than 500 allergic subjects working at the Tor Vergata campus (De Sanctis *et al.*, 2003) showed that 19% were sensible to a mix of Fagaceae, including pollen extract of *Fagus sylvatica* L., *Castanea sativa* Mill. and *Quercus alba* L.. As 20% is about the

prevalence of pollinosis due to *Olea* pollen in central Italy (Troise, 2001), the allergenic activity of *Quercus ilex* pollen is very worth studying.

To investigate the presence of allergenic molecules in the proteic extract of holm oak pollen we let it react with sera a selected sample of allergic subjects, who participated to the described prick test screening (patients were five and they were called A, B, C, D and E).

Sera of these subjects showed reactivity with the proteic extract of holm oak pollen in immunoblotting and ELISA tests. A further indication on the proteic nature of the IgE binding epitopes of the allergens is obtained by testing their resistance to metaperiodate in ELISA test.

In western blotting experiments performed with the proteic extract of holm oak pollen, all the tested sera tested (sera from patients A, B, D and E, because serum C was not enough) elicited more than one positive bands, detected with peroxidase-labeled anti-human IgE. Fagaceae-sensitive patients generate IgE that are directed against a broad spectrum of pollen proteins. Among the several bands detected, two are bound to the IgE of all the sera tested. Their molecular weights are about 28 and 36 kDa. No obvious relationship was found between the degree of sensitivity, as determined by symptoms and skin test reactivity, and the number or intensity of the positive IgE binding bands that were detected by each serum.

In experiment carried out without the 2Mercaptoethanol there were a number of bands that appeared to migrate identically. In particular the two bands at about 28 and 36 kDa were not altered.

In western blotting experiments performed with the proteic extract of holm oak leaves, the two sera tested (from patients D and E) elicited few positive bands detected with peroxidase-labeled anti-human IgE (at about 24, 46 and 61 kDa), but the 28 and 36 kDa bands were not detected.

Western blotting experiments performed with the proteic extract of holm oak pollen showed that two bands were recognized by each serum of the chosen subjects, although they were selected because they were allergic to a mix of Fagaceae pollen extract not including holm oak. These bands, at 28 and 36 kDa, resulted to be specific proteins of the pollen, being not present in the oak leaves. We suggest that these proteins are major allergens of the holm oak pollen. Their molecular weights are higher than those of the allergenic proteins present in other Fagaceae pollen so far studied, as chestnut (whose major allergen is a 22 kDa protein) (Kos *et al.*, 1993), and *Quercus alba* (whose allergen is a 17 kDa protein) (Loria *et al.*, 1989). Also the order of Fagales, to which the Fagaceae family belongs, has plants whose

pollen is very allergenic, e.g. birch, alder, hornbeam and hazel. The major allergens of these pollens are all 17 kDa proteins (Ipsen & Hansen, 1991).

In ELISA test the five tested sera showed reactivity with the extracts, the sera had different degrees of sensitivity. No IgE binding to holm oak proteins was observed in the presence of a non-allergic subject sera, used as control.

Further ELISA tests were carried out to determine the cross reactivity between different pollens of Fagaceae: holm oak (*Quercus ilex* L.), european oak (*Quercus robur* L.), chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). The test showed that all the tested sera (from patients A, B, C and D) reacted with european oak, chestnut and beech pollen extract. Serum from patient E was not tested because it was no longer available. No IgE binding to this pollen proteins was observed in the presence of a non-allergic subject sera, used for the control. ELISA tests showed that all the sera reacted with proteic extract from holm oak pollen, and also with proteic extract from european oak, chestnut and beech pollen, confirming the existence of cross reactivity among plants belonging to the Fagaceae family.

In ELISA test with native and deglycosilated proteins, by the use of sera belonging to subjects A, C, D and E the metaperiodate treated sample ("deg") showed a reduction of reactivity if compared with the untreated ones ("not-deg"). The reduction of reactivity was not observed by using the serum belonging to patient B when metaperiodate treatment was applied.

The ELISA tests with native and deglycosilated proteins showed that the sodium metaperiodate oxidation caused the reduction of reactivity by the use of sera from patients A, C, D and E, while by the use of serum from patient B no reduction in reactivity was observed. If we accept the hypothesis that the metaperiodate destroys the glucidic epitopes of proteins (Iacovacci *et al.*, 2001), we can suggest that allergenic proteins of holm oak pollen have at least some proteic IgE binding epitopes.

To determine the subcellular localization of the allergenic molecules of holm oak pollen, fresh pollen grains were subjected to rapid freeze substitution in liquid propane (freezed by liquid nitrogen) and then embedded in acrilc resin.

After freeze-substitution and acrylic resin embedding, immunogold labelling experiments at TEM were carried out on holm oak pollen, using as primary antibody the IgE fraction from sera A, B, C and D. TEM

observation revealed gold particles on the inner layer of the wall, the intine, and in the electron transparent vesicles of the cytoplasm. No labelling was observed in the outer layer of the wall, exine, or in other compartments of the cytoplasm.

To compare the localization of the allergens in another specie of oak it was carried out the immunogold labelling also on ultrathin sections of european oak pollen processed as above. The immunogold labelling on european oak pollen was performed by making use of the IgE fraction from sera A, B, C and D as primary antibody. TEM observation revealed gold particles in the exine, less in the intine and quite no labelling in the cytoplasm, except for few cluster of gold particles aggregated in the electron transparent vesicles of the cytoplasm.

The results of immunogold labeling on holm oak pollen indicated that there is a localization of allergenic proteins on the inner layer of the pollen wall (intine) and in the electron transparent vesicles of the cytoplasm. As this occurs for all the sera tested, we propose that the labeled proteins are indeed the major allergens of holm oak pollen. The electron transparent vesicles should be carbohydrate or lipidic storages but not starch reserves, because Lugol staining revealed the absence of this kind of storage, confirming the existent literature (Franchi *et al.* 1996).

The immunogold labelling on european oak pollen showed that the allergenic proteins were localized in a very different way: they are concentrated on the outer layer of exine. This suggests that the allergens proteins of the two different oaks are very different, even if there is cross reactivity between them, indicating that the IgE binding epitopes may be similar.

The preliminary results presented in this work show that is very important and necessary to pursue further investigations on the allergenic properties of oaks pollen, in particular in a city like Rome where these plants are extensively present both as spontaneous species and as ornamental plants.

Bibliografia

1. Abbas A.K., Lichman A.H., Pober J.S., 2000. Immunologia cellulare e molecolare. IV edizione italiana. Piccin.
2. Afferni C., Iacovacci P., Barletta B., Di Felice G., Tinghino R., Mari A., & Pini C., 1999. Role of carbohydrate moieties in IgE binding to allergenic components of *Cupressus arizonica* pollen extract. *Clinical & Experimental Allergy* 29(8):1087-1094.
3. Arrigoni PV., Rizzotto M., Zerboni R., Manfredi M., 1995. Flora allergenica e pollinosi. Università degli Studi di Firenze.
4. Attorre F., Bruno M., Francesconi F., Valenti R., Bruno F., 1999. Le alberature stradali. *Verde Ambiente* 3: 57-61.
5. Barletta B., Tinghino R., Corinti S., Afferni C., Iacovacci P., Mari A., Pini C., Di Felice G., 1998. Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen allergens. Identification of cross-reactive periodate-resistant and -sensitive epitopes with monoclonal antibodies. *Allergy* 53: 1 – 8.
6. Bassett I.J., Crompton C.W., Parmelee J.A., 1978. An atlas of airborne pollen grains and common fungus spores of Canada – Canada Dept of Agriculture, Monograph. n 8.
7. Boluda L., Alonso C., Fernandez-Caldas E., 1998. Purification, characterization and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101: 210 – 216.
8. Bousquet J., Cour P., Guerin B., Michel F.B., 1984. Allergy in the Mediterranean area. I. pollen counts and pollinosis of Montpellier. *Clin. Allergy*, 14: 249 – 258.
9. Bradford M.M., 1976. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

10. Brooks J. & Shaw G., 1968. Chemical structure of the exin of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. *Nature* 219 : 522-529.
11. Brunetti A., Serra C., Travaglini A., Mazzitelli A., Palmieri S., 2004. Correlations between pollen concentration and meteorological factors. XI International Palynological Congress, Granada, Spain, July 4-9, 2004.
12. Bullock G.R., 1984. The current status of fixation for electron microscopy: a review. *J. Microsc.* 133(Pt. 1): 1-15.
13. Canini A., Giovinnazzi J., Iacovacci P., Pini C., Grilli Caiola M., 2004. Localization of a carbohydrate epitope recognised by human IgE in pollen of Cupressaceae. *J Plant Res.* 117: 147-153.
14. Carraro G., Lombardo G., Cargnello G., Gerola F.M., 1979. Studies on the embryo sac and on the stigmatic receptivity of *Vitis* cultivars with different productivities (Piccolit giallo and Verduzzo friulano). *Vitis* 18: 285-290.
15. Celesti-Grapow L., 1995. Atlante della flora di Roma. La distribuzione delle piante spontanee come indicatore ambientale. Comune di Roma – Ufficio della tutela ambientale – Università di Roma La Sapienza, Dipartimento di Biologia Vegetale. Árgos Edizioni
16. Ciampolini F., Cresti M., 1981. Atlante dei principali pollini allergenici presenti in Italia. Università di Siena.
17. Corsico R., Falagiani P., Ariano R., Berra D., Biale C., Bonifazi F., Campi P., Feliziani V., Frenguelli G., Galimberti M., Galletti M.T., Liccardi G., Loreti A., Marcer G., Marcucci F., Meriggi A., Minelli M., Nardelli R., Nardi G., Negrini C.A., Papa G., Piu G., Pozzan M., Purello D'Ambrosio F., Riva G., 2000. An epidemiological survey on the allergological importance of some emerging pollens in Italy. *Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, May-June 10 (3): 155 – 161.

18. De Sanctis G., Perricone R., Bizzi E., Greco E., Kroegler B., Modica S., Fontana L., 2003. Prevalenza delle pollinosi in una popolazione di soggetti atopici afferenti al Policlinico Tor Vergata. Le giornate su "Polline e pollinosi nella città di Roma", Università di Roma "Tor Vergata", III giornata - 20 marzo 2003.
19. Di Felice G., Caiaffa M.F., Bariletto G., Afferni C., Di Paola R., Mari A., Palumbo S., Tinghino R., Sallusto F., Tursi A., Macchia L., Pini C., 1994. Allergens of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen: Characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components. *J Allergy Clin. Immunol.*, 94 (3): 547 – 555.
20. Erdtman G., 1969. Handbook of Palynology – Morphology – Taxonomy – Ecology. An Introduction to the study of pollen grains and spores. Scandinavian University Books, Munksgaard.
21. Eriksson N.E., Wihl J.A., Arrendal H., Strandhede S.O., 1984. Tree pollen allergy. II. Sensitization to various tree pollen allergens in Sweden. A multicentre study. *Allergy* 39: 610-617.
22. European Allergy White Paper, 1997. Allergic disease as public health problem, UCB Institute of allergy. Belgium.
23. Fairley D., Batchelder G.L., 1986. A study of oak pollen production and phenology in Northern California: prediction on annual variations in pollen counts based on geographic and meteorologic factors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78: 300-307
24. Feliziani V., 1986. Pollini di interesse allergologico. Guida al loro riconoscimento. Masson Italia Editori, Milano.
25. Franchi G., Bellani L., Nepi M., Pacini E., 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora* 191: 143-159.
26. Frenguelli G., Mincigrucci G., Bricchi E., Romano B., 1991a. Pollini allergenici: morfologia e aspetti microscopici. *Giorn. It. Allerg. Immunol. Clin.* 1: 389-401.

27. Frenguelli G., Spieksma F.Th.M., Bricchi E., Romano B., Mincigrucci G., Nikkels A.H., Dankaart W., Ferranti F., 1991b. The influence of air temperature on the starting dates of the pollen season of *Alnus* and *Populus*. *Grana* 30: 196 – 200.
28. Frenguelli G., Bricchi E., Romano B., Mincigrucci G., Ferranti F., Antognozzi E., 1992. The role of air temperature in determining dormancy release and flowerig of *Corylus avellana* L. *Aerobiologia* 8: 415 – 418.
29. Frenguelli G., 1998. Sorgenti e rilascio di polline in atmosfera. *Giorn It Allergol Immunol Clin*, 8: 67-68.
30. Gerola F.M., Castaldo Cobianchi R., Cristofolini G., Dalessandro G., Gerla P.D., Grilli Caiola M., Scannerini S., Sparsoli E., Tripodi G., 1995. *Biologia e diversità dei vegetali*. UTET, Torino
31. Gomez-Casero M.T., Hidalgo P.J., García-Mozo H., Domínguez E and Galán C., 2004. Pollen biology in four Mediterranean *Quercus* species. *Grana* 43: 22-30.
32. Grilli Caiola M., Mazzitelli A., Capucci E., Travaglini A., 2002. Monitoring of pollinosis and airborne pollen in a Rome university. *Aerobiologia* 18: 267-275.
33. Grote M., 1992. Ultrastructural morphology and allergen detection in birch pollen after aqueous, anhydrous-liquid, and vapor fixation techniques. *Microscopy Reseach and Technique* 21: 242-248.
34. Grote M., Fisher S., Müller W.D., Valenta R., 1998. In situ localization of a high molecular weight cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food by immunogold electron mycroscopy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101: 250 – 257.
35. Grote M., 1999. In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 1 – 6.

36. Hirschwehr R., Jager S., Horak F., Ferreira F., Valenta R., Ebner C., Kraft D., Scheiner O., 1993. Allergens from birch pollen and pollen of the European chestnut share common epitopes. *Clin. Exp. Allergy*, 23: 755 – 761.
37. Hirst J.M., 1952. An automatic volumetric spore trap. *Annals of Applied Biology*, 39: 257 – 265.
38. Hoffmann-Sommergruber K., 2000. Plant allergens and pathogenesis-related Proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122: 155 – 166.
39. Iacovacci P., Pini C., Afferni C., Barletta B., Tinghino R., Schininà E., Federico R., Mari A., Di felice G., 2001. A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitome recognizes an IgE-binding determinant shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. *Clin Exp Allergy* 31: 458-465.
40. Ipsen H., Loewenstein H., 1983. Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). *J Allergy Clin Immunol* 72: 150-159.
41. Ipsen H., Hansen O.C., 1991. The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g 1, Birch (*Betula verrucosa*) Bet v 1, Hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b 1 and oak (*Quercus alba*) Que a 1 pollens. *Mol. Immunol.* 28 (11): 1279 – 1288.
42. Iwanami Y., Sasakuma T., Yamada Y., 1988. Pollen: Illustrations and scanning electronmicrographs – Springer-Verlag.
43. Jarolim E., Rumpold H., Endler A.T., Ebner H., Breitenbach M., Scheiner O., Kraft D., 1989. IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 44: 385 – 395.
44. Jensen W.A., 1962. Botanical Histochemistry. Freeman, San Francisco.

45. Juhasz M., 1998. History of ragweed in Europe. Satellite Symposium Proceedings: Ragweed in Europe. 6th International Congress on Aerobiology – Perugia, Italy 31/8-5/9 1998.
46. Knox B. and Suphioglu C., 1996. Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science* 1(5): 156 – 164.
47. Knox B., Taylor P., Ladiges P., Nelson G., Suphioglu C., 1998. Pollen allergens: molecular and immunological analyses and implications for systematics. In: S.J. Owens and P.J. Rudall (Editors). *Reproductive Biology*, pp. 449 – 463. Royal Botanic Gardens, Kew.
48. Kos T., Hoffmann-Sommergruber K., Ferreira F., Hirschwehr R., Ahorn H., Horak F., Jager S., Sperr W., Kraft D., Scheiner O., 1993. Purification, characterization and N-terminal amino acid sequence of a new major allergen from European chestnut pollen *Cas s* 1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 196 (3) 1086 – 1092.
49. Kuby J., 1994. *Immunologia*. Ed. UTET – Torino.
50. Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-684
51. Lancelle S.A., Callahan D.A., Hepler P.K., 1986. A method for rapid freeze fixation of plant cells. *Protoplasma* 131, 153-165.
52. Lancelle S.A., Hepler P.K., 1989. Immunogold labelling of actin on sections of freeze-substituted plant cells. *Protoplasma* 150: 72-74.
53. Laurent J., Lafay M., Lattanzi B., Le Gall C., Sauvaget J., 1993. Evidence for chestnut pollinosis in Paris. *Clin. Exp. Allergy*, 23: 39 – 43.
54. Leonardi D., Mazzitelli A., Travaglini A., Grilli Caiola M., 2001. “SEM application in discrimination of pollen grains.” 5th Multinational Congress on Electron Microscopy, September 20 – 25, 2001. Lecce – Italy.

55. Leporatti M.L., Vincolato L., Di Gioacchino M. (2000) – Allergenic flora of Chieti town (Abruzzo, Central Italy): preliminary observations – *Allionia*, 37: 201-216.
56. Linskens H.F. and Cresti M., 2000. Pollen-allergy as an ecological phenomenon: a review. *Plant Biosystems*, 134:341-352.
57. Loria R.C., Wilson P., Wedner J., 1989. Identification of potential allergens in white oak (*Quercus alba*) pollen by immunoblotting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84: 9 – 18.
58. Luscri M.F., Li Bianchi E., Fanti A., Scarnati C., Cecconi M.E., Marinelli M.A.: 1996, Tree pollen allergy in Rome. *Allergy* 51: 388, 121
59. Main C.E., 2003. Aerobiological, ecological and health linkages. *Environmental International* 29: 347-349.
60. Mandrioli P., 1994. Metodiche di campionamento e conteggio dei granuli pollinici e delle spore fungine aerodisperse. In: Monitoraggio aerobiologico in Emilia Romagna. Collana prevenzione nei luoghi di vita e di lavoro. “Contributi” n° 30, 9 – 19 Regione Emilia Romagna, Unità Sanitaria Locale n° 31, Elixartigrafiche Ferrara.
61. Mandrioli P., 1998. The development of aerobiology. Letture del congresso di Perugia – Italy, 31/8 – 5/9/1998: 11-13.
62. Martinez L.B. and Wick S.M., 1991. The use of freeze-substitution and LR Gold in the study of rye grass (*Lolium perenne*) pollen. *Journal of Electron Microscopy Techniques* 18: 305-314.
63. Mazzitelli A., Grilli Caiola M., 2003a. Cross-recognition of Fagaceae pollen allergen by IgE raised against allergen of *Cupressus arizonica* pollen. *Acta Biologica Cracoviensia -Series Botanica-* 45/1: 115-118.
64. Mazzitelli A., Grilli Caiola M., 2003b. Studio sull'allergenicità del polline di Fagaceae. Riunione congiunta Gruppi di Lavoro Biologia

- Cellulare e molecolare e Biotecnologie e differenziamento. Falerna Lido (Cz), 2-4 luglio 2003: pag 9.
65. Mazzitelli A., Travaglini A., Grilli Caiola M., 2004. Identification of in Holm oak (*Quercus ilex* L.) pollen allergens by immunoblotting. XI International Palynological Congress, Granada, Spain, July 4-9, 2004. pag 99.
66. Mazzitelli A., Travaglini A., Capucci E., Grilli Caiola M. Pollen related allergies: a 4 year epidemiological survey at the University of Rome "Tor Vergata" (alle stampe)
67. Negrini A.C., 1992. Pollens as allergens. *Aerobiologia* 8: 9 – 15.
68. Niederberg V., Pauli G., Grönlund H., Fröschl R., Helmut R., Kraft D., Valenta R., Spitzauer S., 1998. Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel and oak pollen: A quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102: 579 – 591.
69. Ong E.K., Singh M.B., Knox R.B., 1995. Aeroallergens of plant origin: molecular basis and aerobiological significance. *Aerobiologia* 11: 219 – 229.
70. Pearce A.G.E., 1985. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol 1. Churchill – Livingstone, London.
71. Piao King T., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A.E., Thomas W., 1994. Allergen nomenclature. *Int Arch Allergy Immunol*, 105: 224-233.
72. Pignatti S., 1985. *Flora d'Italia*. Edagricole.
73. Prados M., Aragon R., Carranco M.I., Martinez A., Martinez J., 1995. Assessment of sensitization to holm oak (*Quercus ilex*) pollen in the Mérida area (Spain). *Allergy* 50: 456 – 459.

74. Punt W., Blackmore S., Nilsson S., Le Thomas A., 1994. Glossary of pollen and spore terminology. LPP Contributions Series No1, LPP Foundation, Utrecht.
75. Schagger H., Von Jagow G., 1987. Tricine-sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem* 166: 368-379.
76. Seiberler S., Scheiner O., Kraft D., Lonsdale D., Valenta R., 1994. Characterization of a birch pollen allergen, Bet v III, representing a novel class of Ca^{2+} binding proteins; specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca^{2+} . *The EMBO Journal* 13 (15): 3481 – 3486.
77. Singh M.B., Hough T., Theerakulpisut P., Avjioglu A., Davies S., Smith P.M., Taylor P., Simpson R.J., Ward L.D., McCluskey J., Puy R., Knox R.B., 1991. Isolation of cDNA, encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1384-1388.
78. Spangfort M.D., Mirza O., Holm J., Larsen J.N., Ipsen H., Lowenstein H., 1999. The structure of major birch pollen allergens – epitopes, reactivity and cross-reactivity. *Allergy* 54: 23-26.
79. Spieksma F.Th.M., 1990. Allergenic plants in different countries. In: Falagiani P., Pollinosis, CRC Press Inc., Boca Raton: 19-37.
80. Spurr A.B., 1969. A low-viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26: 31-43.
81. Subiza J., Jerez M., Jimènez J.A., Narganes M.J., Cabrera M., Varela S., Subiza E., 1995. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol* 96: 15-23.
82. Suphioglu C., Singh M.B., Taylor P., Bellomo R., Holmes P., Puy R., Knox R.B., 1992. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 339: 569-572.

83. Taylor P.E., Staff I.A., Singh M.B., Knox R.B., 1994. Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. *Histochem J* May;26(5):392-
84. Tejera M.L., Villalba M., Batanero E., Rodríguez R., 1999. Identification, isolation and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104: 797 – 802.
85. Thierry J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6: 987-1018.
86. Travaglini A., Canini A., Grilli Caiola M., 1991. Alberi secolari delle Ville Tuscolane. *Museol. Sci.* 8 (1-2): 23-27.
87. Travaglini A., Ravaziol D., Grilli Caiola M., 2000. A meteorological station and a pollen trap at the botanical garden and arboretum of the University of Rome Tor Vergata. *Aerobiologia*, 16: 303 – 307.
88. Travaglini A., Mazzitelli A., Leonardi D., Grilli Caiola M., 2002a. Monitoraggio di polline urbano e allergie. In *Atti dell'Accademia dei Lincei Conferenza annuale della Ricerca: Ecosistemi urbani*: 22-24/10/2001
89. Travaglini A., Cialdini F., Mazzitelli A., Leonardi D., Grilli Caiola M., 2002b: “Il centro di monitoraggio aerobiologico di Roma Tor Vergata, quattro anni di registrazioni” Congresso della Società Botanica Italiana, Lecce 24-27/9/2002
90. Travaglini A., Mazzitelli A., Mastroianni M., 2002c “Il monitoraggio aerobiologico come strumento di controllo della flora di un territorio: il caso di Ambrosia a Roma”. Congresso della Società Botanica Italiana, Lecce 24-27/9/2002.
91. Travaglini A., Mazzitelli A., 2003. A method to control the spread of allergenic pollen in archaeological and high frequented areas. *Aerobiologia* 19 (3-4): 185-190.

92. Troise C., 2001. Epidemiologia della pollinosi nella area del Mediterraneo. *Giorn It Allergol Immunol Clin*; 11:63-67.
93. Varela S., Mendez J., Gonzalez de la Cuesta C., Iglesias I., Gonzalez C., Menendez M., 2003. Characteristics of pollinosis caused by *Betula* in patients from Ourense (Galicia, Spain). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 13(2): 124-30.
94. Verlati G., Corsico A., Villani S., Cerveri I., Migliore E., Accordini S., *et al*. Is the prevalence of adult asthma and allergic rhinitis still increasing? Results of an Italian study. *J Allergy Clin Immunology* 2003;111(6):1232-1238.
95. Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresti M., 2003. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 24(14):2369-75.
96. Woodward M.P., Young W.W., Bloodgood RA., 1985. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J Immunol Methods*; 78:143-53.
97. Wüthrich, B., 1989. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol*. 90: 3 – 10.

Preliminary investigation to reveal cross recognition between IgE raised against allergen of *Cupressus arizonica* pollen on Fagaceae pollen

Mazzitelli A., Grilli Caiola M.

Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica, 1 – 00133 Rome; e-mail: anna.mazzitelli@uniroma2.it

Summary

The objective of this study is to investigate the cross reactivity between allergens of Cupressaceae and Fagaceae pollen. Human IgE raised against *Cupressus arizonica* pollen allergen was used to demonstrate the presence of related allergens on ultrathin section of Fagaceae pollen (*Quercus ilex*, *Castanea sativa*, *Fagus sylvatica*). The tissue localization of the cross-reactive allergen was investigated by immunogold electron microscopy.

Observation at transmission electron microscope showed that IgE raised against *C. arizonica* allergen recognizes epitopes on Fagaceae pollen. The cross-reactive allergens can be localized on the wall and in the cytoplasm.

Key words

Pollen allergen, Immunogold labelling, Cross reactivity

Introduction

The release of pollen in the air is a normal part of the sexual cycle in anemophilous plants.

Before its dispersion, pollen is dehydrated and slows its metabolic activity. It recovers its activity when it comes in contact with a source of humidity, that can be atmospherical, the humidity of the stigma, or the one of the respiratory system of a subject. When pollen re-hydrated, it releases molecules that are probably involved in the process of sexual plant reproduction.

Some of these molecules can interact with the immune system of humans inducing it to produce antibodies (IgE), eliciting allergic symptoms as hayfever and asthma (Knox and Suphioglu, 1996).

Allergenic molecules are usually proteins or glycoproteins, with a molecular weight range from 10 to 70 Kda, and they are variously localized in pollen grain: in the wall, in the cytoplasm, in various part, as endoplasmic reticulum, starch grains or also in the nucleus (Grote, 1999).

Pollinosis, allergies due to pollen, are in continuous increasing since the last century (European Allergy White Paper, 1997).

Often, allergenic proteins share common epitopes with other proteins present in pollen of many other species or plant derived food, so that there can be a large cross reactivity among them. A way to establish if a pollen is allergenic or not is to check the reaction of human IgE to hypothesized allergenic pollen.

Several species widely diffused in Italy belong to Fagaceae family as *Quercus ilex* L., *Castanea sativa* Mill., and *Fagus sylvatica* L.. These species grow spontaneously in Latium, are used for reforestation, and they are also used in the city avenues and in urban parks for ornamental purposes.

Fagaceae are anemophilous plants, so during their flowering season they produce a great amount of pollen that is released in the air.

At "Tor Vergata" University is active an airborne monitoring centre that manages three stations set in the city of Rome. From May to July it is recorded high level of pollen belonging to the three genera object of this study in the three stations of Rome (average daily concentration of 40 grains/m³ of air, with maximum peaks of 450 g/m³ for *Quercus* and of 350 for *Castanea*) (Travaglini et al., 2002).

From a monitoring on the diffusion of pollinosis based on the distribution of questionnaires to personnel of Tor Vergata University (students, Professors, researchers, technician) it has emerged that 3% of the allergic subjects referred to be sensible to Fagaceae pollen (Grilli et al., 2002).

However in literature there are very few data on the allergenic activity of Fagaceae pollen, and often the data are disaccording (Subiza et al., 1995; Negrini et al., 1992; Prados et al., 1995).

The aim of this study is to investigate the cross reactivity between *Cupressus arizonica* pollen and the three Fagaceae species: *Quercus ilex*, *Castanea sativa*, *Fagus sylvatica*.

Applying an immunocytochemical method with human IgE raised against extracts of *Cupressus arizonica* pollen on ultra thin section of Fagaceae pollen it has been investigated the presence of similar molecules in the two pollen families.

Human IgE raised against *C. arizonica* pollen recognize a glucidic epitope of a glycoprotein formed by 7 residues (Iacovacci et al., 2001).

Materials and Methods

Pollen from *Quercus ilex*, *Castanea sativa* and *Fagus sylvatica* was collected respectively at Tor Vergata University, at Arcinazzo Romano

(Rome) and at Ovindoli (Aquila) from ripe anthers in may – june 2001. Pollen was fixed in and 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer, dehydrated and embedded in Epon resin.

The labelling was obtained by incubation of ultrathin section of embedded pollen with human IgE purified from the blood of a subject sensible to *Cupressus arizonica* pollen. The first antibody was revealed with a secondary antibody (rabbit anti human IgE), and a tertiary gold conjugated antibody (goat anti rabbit IgG). The labelling was observed at transmission electron microscope ZEISS CEM 902 at 80 KV.

For the observations at scanning electron microscope pollen was dehydrated in ethanol, critical point dried, mounted on aluminium stubs, sputtered and observed at ZEISS DSM 950.

Results

Castanea sativa pollen is very small, with a major diameter of 10-12 mm. It is tricolporate with long colpi and small pori. The exine is rugulate, with soft sculptures (Figure 1).

Fagus sylvatica pollen is big (40-45 mm of diameter), tricolporate with short colpi and big pori. The exine is thin and rugulate with heavy sculptures (Figure 2). In the cytoplasm there is a great number of organules.

Quercus ilex pollen have medium dimensions (20-25 mm in diameter). It is tricolporate with large colpi. The exine is verrucate-rugulate (Figure 3). The cytoplasm is rich of organules.

Results of the immunogold labelling indicate that human IgE raised against *Cupressus* recognizes glucidic epitopes of proteins on the Fagaceae pollen tested.

Castanea sativa pollen was labelled on the wall and also into the cytoplasm (Figure 4).

Fagus sylvatica pollen was labelled in particular on cytoplasmic organules and on the nucleus (Figures 5).

Quercus ilex pollen shows an intense labelling over the grain, in particular on the esine and intine (Figures 6 - 7).

Discussion

IgE raised against *Cupressus* allergen recognise the glucidic epitope of proteins present in Fagaceae pollen. Although this epitop can be largely diffused, we can hypothesise that there is cross reactivity between the allergen of pollen of these two families of plants.

Allergy caused by Cupressaceae pollen is well identified because *Cupressus*, the genus that product the major amount of pollen, blossoms in winter, so the allergic symptoms can be recognised and attributed to it.

On the contrary, Fagaceae blossom in spring and early summer, together with several well known allergenic plants, such as Gramineae, Olive, Parietaria and others. So allergic symptoms due to Fagaceae pollen can be confused with other pollinosis. Besides Fagaceae pollen gives only poly-sensibilization, so it is very difficult to discriminate its pollinosis from others.

For this reason it is very important to investigate this family of plant to clarify the allergenic activity of its pollen.

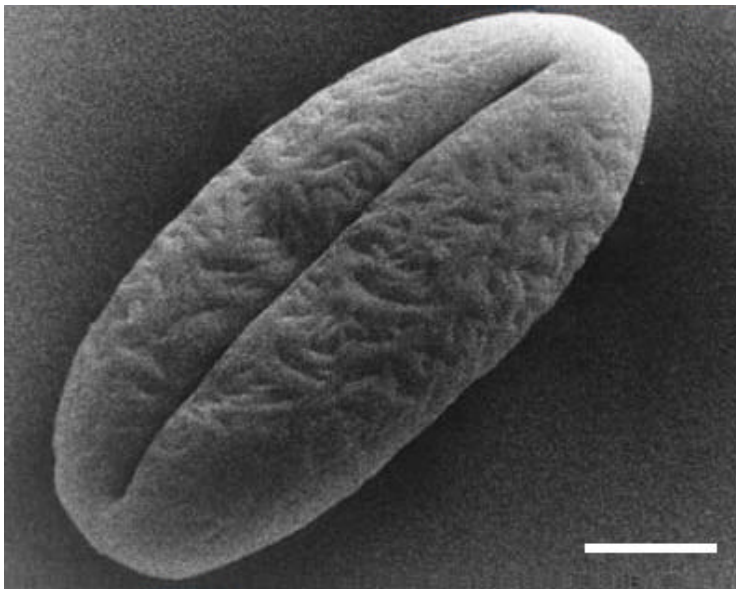


Figure 1

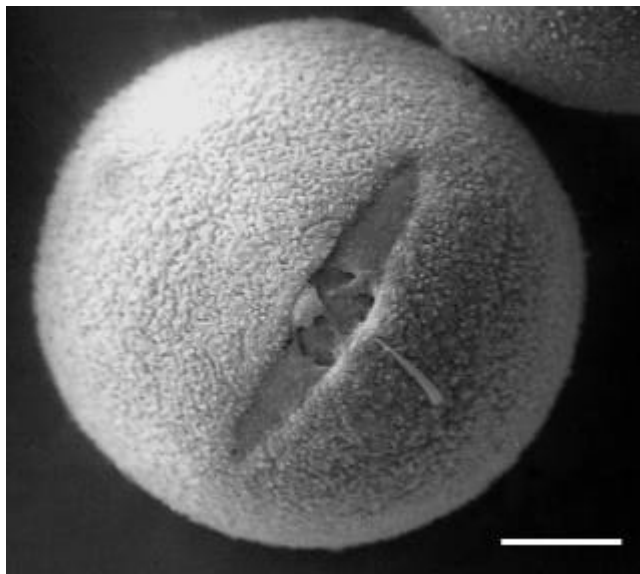


Figure 2

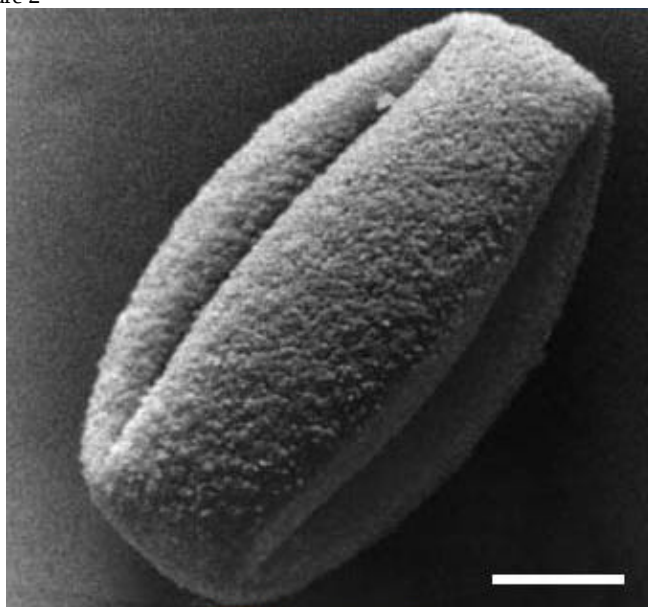


Figure 3

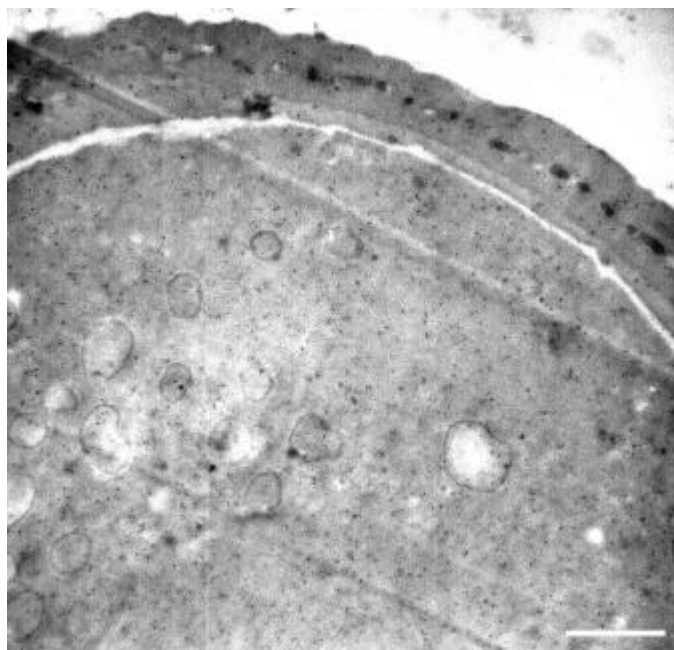


Figure 4

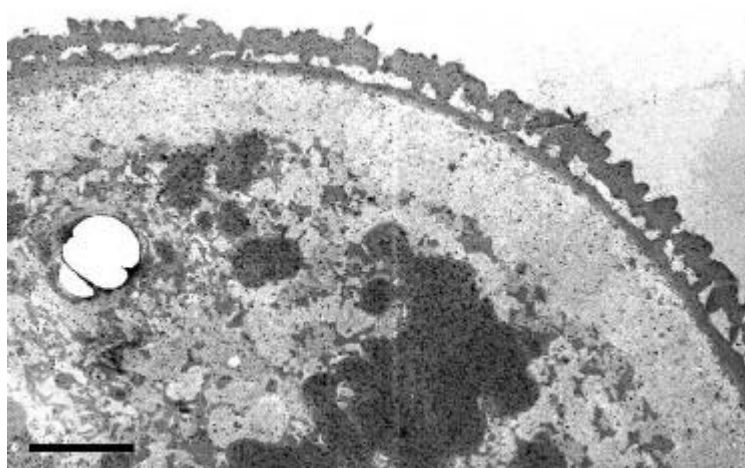


Figure 5

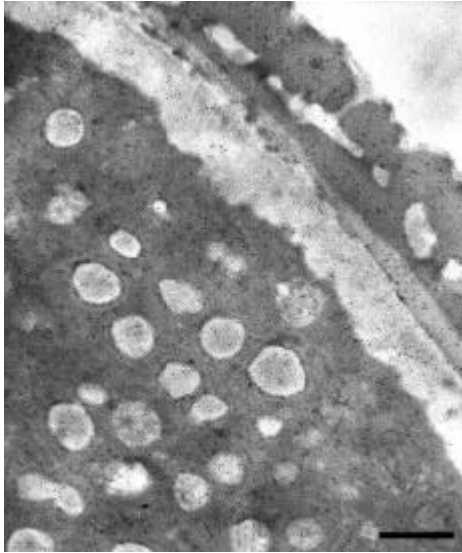


Figure 6

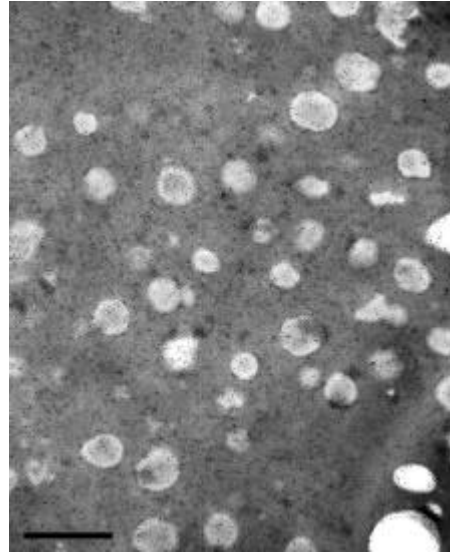


Figure 7

Fig. 1: *Castanea sativa* pollen grain at Scanning electron microscope. It is visible the rugulate exine. Bar = 2 μm .

Fig. 2: *Fagus sylvatica* pollen grain at Scanning electron microscope. It is visible the rugulate exine. Bar = 9 μm .

Fig. 3: *Quercus ilex* pollen grain at Scanning electron microscope. It is visible the scabrate- rugulate exine. Bar = 5 μm .

Fig 4: Ultrathin section of *Castanea sativa* pollen grain labeled with human IgE anti *Cupressus arizonica* revealed with goat anti rabbit IgG coupled with 5 nm gold particles. There are gold markers in the cytoplasm (on organules and cytosol) and on the wall. Magnification: 12,000X. Bar = 1.2 μm .

Fig 5: Ultrathin section of *Fagus sylvatica* pollen grain labelled with human IgE anti *Cupressus arizonica* revealed with goat anti rabbit IgG coupled with 10 nm gold particles. There are gold markers in the cytoplasm, on organules and on nucleus. Less labelling is present on the wall. Magnification: 3,000X. Bar = 2.5 μm .

Fig 6: Ultrathin section of *Quercus ilex* pollen grain labelled with human IgE anti *Cupressus arizonica* revealed with goat anti rabbit IgG coupled with 5 nm gold particles. There are gold markers on the wall, and less labelling on the cytoplasm. Magnification: 12,000X. Bar = 1 μ m.

Fig 7: Particular of the cytoplasm of *Quercus ilex* with gold labelling. Magnification: 12,000X. Bar = 1 μ m.

References

EUROPEAN ALLERGY WHITE PAPER, 1997. Allergic disease as a public health problem. *UCB Institute of Allergy*. Belgium.

GRILLI CAIOLA M. MAZZITELLI A. , CAPUCCI E., TRAVAGLINI A., 2002. Monitoring of pollinosis and airborne pollen in a University of Rome. *Aerobiologia* (in press).

GROTE M., 1999. In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118: 1 – 6.

IACOVACCI P., PINI C., AFFERNI C., BARLETTA B., TINGHINO R., SCHININA' E., FEDERICO R., MARI A., DI FELICE G., 2001. A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant shared by taxonomically unrelated allergenic pollens. *Clin. Exp. All.* 31: 458 – 465.

NEGRINI A.C., ARROBBA D., 1992. Allergenic pollens and pollinosis in Italy: recent advances. *Allergy* 47: 371 – 379.

KNOX B. AND SUPHIOGLU C., 1996. Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science* 1(5): 156 – 164.

PRADOS M., ARAGON R., CARRANCO M.I. MARTINEZ J., 1995: Assessment of sensitization to holm oak (*Quercus ilex*) pollen in the Mérida area (Spain). *Allergy* 50: 456 – 459.

SUBIZA J., JEREZ M., JIMONEZ J.A., NARGANES M.J., CABRERA M., VARELA S., SUBIZA E., 1995. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96: 15 – 23.

TRAVAGLINI A., MAZZITELLI A. LEONARDI D. GRILLI CAIOLA M., 2002. Monitoraggio di polline urbano e allergie. In: Atti dell'Accademia dei Lincei. Conferenza annuale della Ricerca: Ecosistemi Urbani: 22-24/10/2001.

Al termine di questo lavoro desidero ringraziare le persone che mi sono state vicine e che mi hanno offerto il loro aiuto.

Innanzitutto ringrazio la Professoressa Maria Grilli Caiola, che mi ha dato l'opportunità di crescere dal punto di vista professionale ed è stata sempre disponibile a cercare di risolvere i molti problemi che si incontrano quando si affronta un lavoro scientifico.

Ringrazio la Prof.ssa Antonella Canini per avermi reso indipendente consentendomi di condurre questo lavoro in piena autonomia decisionale e operativa.

Ringrazio la Prof.ssa Patrizia Albertano per la revisione critica della tesi, e per i consigli costruttivi che mi ha dato per completare e migliorare la stesura del lavoro.

Ringrazio la Dott.ssa Patrizia Iacovacci per essere stata sempre disponibile, per avermi aiutato in tutte le fasi del lavoro e per essere stata mia amica sincera.

Ringrazio il Prof. Mauro Cresti e il Dott. Claudio Milanesi del Dipartimento di Biologia Ambientale dell'Università di Siena per la collaborazione nello svolgimento del lavoro di microscopia elettronica.

Ringrazio la Dott.ssa Donatella Leonardi per l'aiuto professionale e tecnico, per l'affetto e la compagnia offertami in questi anni.

Ringrazio Valentina Corvino che mi ha regalato la molla per iniziare.

Ringrazio la mia amica Lorena, che è per me punto di riferimento dal nostro primo giorno a Tor Vergata.

Ringrazio Alessandro per l'amicizia che ha saputo dimostrarmi in questi anni.

Ringrazio Roberto Targa, Stefano Valente, Elena Bachiddu, Adalgisa Montoro, Daniela Billi, Cinzia Forni, Anna Maria Della Libera con i quali ho condiviso piacevoli momenti di lavoro e di pausa.

Ringrazio le persone che nel corso di questi anni hanno frequentato il laboratorio di Botanica e con le quali ho condiviso parole, favori, sorrisi e arrabbiate: Silvia, Monica, Rossella, Sara, Marianna, Daniela, Laura, Simona, Antonella, Emanuela, Roberta.

Ringrazio il mio amico Virgilio, perché nonostante la lontananza mi è stato più vicino dei miei vicini, e il mio amico Oreste, che ha cercato di insegnarmi a prendere caffè.

Ringrazio mio papà, mia mamma, mia sorella Irene, mio fratello Giulio, mio zio Mario, perché nonostante tutto sono stati sempre dalla mia parte. Ringrazio la mia famiglia acquisita: Teresa, Gloria, Paola, Pierluigi, Fabrizio, Sara, Daniela, Valter, Mirko, Barbara, Gina, Mauro, Barbara, Giampaolo, Pino e Marilva.

E infine non ringrazio mio marito Stefano, non sarebbe mai abbastanza per esprimergli quello che rappresenta per me; allora ringrazio Dio per averlo mandato nella mia vita, per renderla così felice.