

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Alimentari
Ciclo XXV

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELL'ALLERGENE LIPID
TRANSFER PROTEIN DI POMODORO

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. DAVIDE BARBANTI

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa CLAUDIA FOLLI

Dottoranda: CLAUDIA RASORE

Ai miei genitori

INTRODUZIONE.....	12
1. LE ALLERGIE ALIMENTARI.....	12
1.1 Aspetti generali e classificazione delle allergie alimentari.....	12
1.2 Meccanismi immunitari dell'allergia alimentare.....	15
1.3 Metodi diagnostici per le allergie alimentari.....	16
2. GLI ALLERGENI ALIMENTARI.....	18
2.1 Caratteristiche generali degli allergeni alimentari.....	18
2.2 Determinanti di allergenicità.....	20
2.3 Effetti del <i>food processing</i>	23
2.4 Panallergeni e cross-reattività.....	24
2.5 Aspetti legislativi.....	25
2.6 Epitopi per cellule B.....	27
3. ALLERGENI RICOMBINANTI.....	30
3.1 Aspetti generali.....	30
3.2 Applicazioni diagnostiche e terapeutiche.....	31
4. ALLERGENI ALIMENTARI DI ORIGINE VEGETALE.....	33
5. <i>Non specific LIPID TRANSFER PROTEIN</i>	39
5.1 Aspetti generali.....	39
5.2 Studi strutturali.....	40
5.3 Ruolo biologico.....	42
5.4 nsLTPs come allergeni alimentari.....	43
5.5 “Mappaggio degli epitopi” delle nsLTPs.....	45
6. GLI ALLERGENI DEL POMODORO.....	46
6.1 Il pomodoro.....	46
6.2 Gli allergeni del pomodoro.....	48
6.3 LTP di pomodoro.....	49
SCOPO DELLA RICERCA.....	52
PARTE I.....	56
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	56
1. ESTRAZIONE DI RNA DI BUCCIA, POLPA E SEMI DI POMODORO.....	56

2.	RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR).....	57
2.1	Progettazione dei <i>primers</i> per l'isolamento di cDNA codificante per nsLTPs in pomodoro e RT-PCR.....	57
3.	ANALISI NORTHERN BLOTTING DI RNA TOTALE DI BUCCIA E POLPA DI POMODORO.....	58
3.1	Preparazione delle sonde biotilate per LTP presenti in Buccia e Polpa di pomodoro.....	58
3.2	Analisi Northern Blotting.....	59
4.	PREPARAZIONE DELLE SONDE SPECIFICHE PER LE SINGOLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LE LTP DI POMODORO (<i>3'-Rapid Amplification of cDNA ends</i>).....	62
	MATERIALI E METODI.....	66
1.	ESTRAZIONE DI RNA DI BUCCIA, POLPA E SEMI DI POMODORO.....	66
1.1	Preparazione dei tessuti vegetali di polpa, buccia e semi.....	66
1.2	Estrazione RNA totale mediante l'impiego di Cloruro di Litio.....	66
1.3	Quantificazione mediante misura spettrofotometrica dell'RNA estratto.....	67
1.4	Analisi elettroforetica dell'RNA totale in condizioni denaturanti.....	67
2.	RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR).....	68
2.1	Retrotrascrizione di mRNA totale.....	68
2.2	Progettazione dei <i>primers</i> per l'isolamento di cDNA codificante per nsLTPs di pomodoro.....	68
2.3	Amplificazione del cDNA generato da retrotrascrizione di mRNA totale.....	69
2.4	Purificazione dell'amplificato.....	69
3.	ANALISI NORTHERN BLOTTING.....	70
4.	PREPARAZIONE DELLE SONDE SPECIFICHE PER LE SINGOLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LE LTP DI POMODORO (<i>3'-rapid amplification of cDNA ends</i>).....	72
	PARTE II.....	76
	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	76
1.	IDENTIFICAZIONE DELLE ISOFORME DI LTP DI POMODORO.....	76
1.1	Clonaggio dei cDNA codificanti per nsLTP di pomodoro e sequenziamento.....	76
2.	AMPLIFICAZIONE DELLE SEQUENZE INDIVIDUATE CODIFICANTI PER LTP DI	

POMODORO.....	77
2.1 Progettazione dei <i>primers</i>	77
2.2 Amplificazione delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro.....	78
2.3 Clonaggio delle sequenze amplificate nel vettore pGEM-T-easy.....	78
3. CLONAGGIO DELLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO NEL VETTORE DI ESPRESSIONE pET-11b.....	79
3.1 Inserimento dei siti di restrizione per BamHI e NdeI e clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore intermedio pGEM-T-EASY.....	79
3.2 Clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore di espressione pET-11b.....	80
4. ESPRESIONE IN FORMA RICOMBINANTE DELLE ISOFORME DI LTP DI POMODORO.....	81
4.1 Prova di induzione e solubilità e ottimizzazione delle condizioni di espressione.....	81
5. PURIFICAZIONE DELL'ISOFORMA X ₅₆₀₄₀ DI LTP DI POMODORO.....	82
6. CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELL'ISOFORMA X ₅₆₀₄₀ DI LTP DI POMODORO.....	83
6.1 Prove di legame della lisolecitina lyso C ₁₆ a LTP di pomodoro.....	83
6.2 Misure di dicroismo circolare.....	84
7. CARATTERIZZAZIONE DELL'ISOFORMA X ₅₆₀₄₀ DI LTP DI POMODORO COME ALLERGENE.....	87
7.1 Saggio di ELISA INHIBITION (Metodo ISAC-Immuno Solid-phase Allergen chip).....	87
8. ESPRESIONE IN FORMA RICOMBINANTE E PURIFICAZIONE DELLE ISOFORME AK224707, AM051295 E AM051296 DI LTP DI POMODORO.....	89
8.1 Induzione e purificazione dell'isoforma AK224707 di LTP di pomodoro.....	89
8.2 Induzione e purificazione delle isoforme AM051295 e AM051296 di LTP di pomodoro.....	90
 MATERIALI E METODI.....	 94
1. IDENTIFICAZIONE DELLE ISOFORME DI LTP DI POMODORO.....	94
1.1 Clonaggio dei cDNA codificanti per nsLTP di pomodoro e sequenziamento.....	94
2. AMPLIFICAZIONE DELLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO.....	95
2.1 Progettazione di <i>primers</i>	95

2.2	Amplificazione delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro.....	95
2.3	Purificazione dell'amplificato.....	96
3.	CLONAGGIO DELLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO NEL VETTORE DI ESPRESSIONE pET-11b.....	97
3.1	Clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore intermedio pGEM-T-EASY.....	97
3.2	Inserimento dei siti di restrizione per BamHI e NdeI e clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore intermedio pGEM-T-EASY.....	97
3.3	Clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore di espressione pET-11b.....	98
4.	ESPRESSIONE IN FORMA RICOMBINANTE DI LTP DI POMODORO.....	99
4.1	Prova di induzione ed ottimizzazione delle condizioni di espressione.....	99
4.2	Verifica della solubilità di LTP di pomodoro.....	100
5.	PURIFICAZIONE DI LTP DI POMODORO.....	100
5.1	Cromatografia a scambio cationico.....	100
5.2	Determinazione della concentrazione di LTP di pomodoro.....	101
6.	CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DI LTP DI POMODORO.....	101
6.1	Prove di legame della lisolecitina lyso C ₆ a LTP di pomodoro.....	101
6.2	Misure di dicroismo circolare.....	101
7.	CARATTERIZZAZIONE DELLE LTP DI POMODORO COME ALLERGENI.....	103
7.1	Saggio di ELISA INHIBITION(Metodo ISAC-Immuno Solid-phase Allergen chip).....	103
	CONCLUSIONI.....	106
	BIBLIOGRAFIA.....	112

INTRODUZIONE

1.LE ALLERGIE ALIMENTARI

1.1.Aspetti generali e classificazione delle allergie alimentari

Le allergie alimentari sono reazioni immunitarie avverse che si verificano in seguito all'ingestione di sostanze comunemente conosciute come allergeni e che danno origine ad una vasta sintomatologia. Studi focalizzati su allergie ai latticini, uova, arachidi e pesce hanno determinato che la prevalenza delle allergie alimentari risulta essere approssimativamente del 3.5%; le reazioni avverse agli alimenti ed agli additivi devono pertanto essere considerate un problema di salute pubblica. La prevalenza dell'ipersensibilità agli alimenti risulta maggiore nell'età evolutiva a causa dell'imaturità del tratto gastrointestinale e si riduce con l'età (1), contrariamente studi demografici hanno dimostrato che l'introduzione prematura di specifici alimenti nell'alimentazione dell'individuo può avere effetti protettivi nello sviluppo delle allergie alimentari. In generale diversi fattori soggettivi influenzano lo sviluppo delle allergie alimentari come l'area geografica in cui vive il soggetto e le abitudini alimentari tipiche del luogo. Per esempio le arachidi e le noci sono i principali alimenti implicati in reazioni allergiche negli USA e Regno Unito (2); diversamente nell'Europa Centrale e nell'area Mediterranea la prevalenza di allergie alle arachidi decresce mentre risultano maggiormente diffuse le allergie alla noce ed ai frutti appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae*. Nella maggior parte dei casi il consumo di frutta fresca è la causa più frequente di allergia alimentare in individui di età superiore ai cinque anni. Sebbene il livello di sensibilità vari a seconda dell'area geografica, le più comuni allergie, denominate *The big eight*, sono reazioni avverse al latte, uova, arachidi, noci, frutti di mare, crostacei, soia e frumento.

La sintomatologia causata da reazioni allergiche è estremamente varia e soggettiva ma è possibile ricondurla a reazioni legate al tratto gastrointestinale (rigonfiamenti e pruriti della bocca e delle labbra, nausea, vomito, dolori addominali, coliti, crampi e diarrea) al cavo orale ed alla pelle (OAS-Sindrome Orale Allergica) ed al tratto respiratorio (riniti, asma e bronco costrizione). La reazione più grave è quella di tipo sistemico, ovvero lo shock anafilattico caratterizzato da contrazione della muscolatura liscia con costrizione delle vie respiratorie, ostruzione per rigonfiamento delle alte vie respiratorie e della bocca, crollo della pressione

sanguigna e perdita di conoscenza. Oltre alla manifestazione clinica, le allergie alimentari sono classificate in base ai meccanismi patogenetici associati; le allergie alimentari possono essere IgE mediate e non IgE mediate. Le prime sono reazioni di ipersensibilità di tipo I mediate da anticorpi o immunoglobuline e sono caratterizzate dall'attivazione rapida, in presenza dell'allergene, dei mastociti e dei basofili sensibilizzati. Il risultato è la comparsa immediata della sintomatologia allergica fino ad un interessamento sistemico molto grave quale l'anafilassi.

Varie sono invece le tipologie di ipersensibilità alimentare non IgE mediate che possono essere definite come il risultato di reazioni immunoallergiche dipendenti da:

- anticorpi differenti dalle IgE (IgA, IgM e IgG);
- immunità cellulo mediata (coinvolgimento di linfociti T, effettori citotossici che provocano la distruzione cellulare, stimolano i macrofagi e neutrofilii amplificando la risposta immunitaria).

Ad esempio il morbo celiaco rappresenta l'enteropatia ad oggi maggiormente studiata, è causata da un'anomala reazione alla gliadina, proteina del glutine generalmente presente nei più comuni cereali, che determina una risposta immunitaria di tipo cellulo mediata in associazione alla produzione di anticorpi della classe IgA e IgG, risultante in una reazione infiammatoria che danneggia la mucosa intestinale.

Di seguito in Figura 1 è riportata la classificazione delle reazioni allergiche in IgE mediate e non IgE mediate; in genere le reazioni avverse con sintomatologia allergica immediata a seguito dell'ingestione di alimenti, sono reazioni IgE mediate.

	IgE-mediated type	Mixed type	Non-IgE-mediated type
Gastrointestinal (GI)	Immediate GI hypersensitivity Oral allergy syndrome	Allergic eosinophilic gastro-enterocolitis	Dietary protein enterocolitis Dietary protein proctitis Dietary protein enteropathy Celiac disease
Cutaneous	Urticaria Angioedema	Atopic dermatitis	Dermatitis herpetiformis
Respiratory	Allergic rhinitis	Asthma	Food-induced pulmonary hemosiderosis (Heiner syndrome)
Systemic	Anaphylaxis		

IgE, immunoglobulin E.

Figura 1. Classificazione in base al meccanismo patogenetico delle reazioni allergiche alimentari.

In generale le allergie alimentari sono più ampiamente classificate come *adverse food reaction*, ovvero reazioni che si verificano solo in alcuni individui che mostrano ipersensibilità verso gli allergeni alimentari. In realtà le reazioni avverse agli alimenti sono molteplici e complesse, per tale motivo l'ente EAACI (*European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) ha proposto una classificazione delle principali reazioni patologiche da ingestione di alimenti. Tali reazioni sono principalmente suddivisibili in *toxic* e *non toxic food reactions*; le prime sono reazioni tossiche che sopraggiungono in qualsiasi individuo esposto ad una dose sufficientemente alta di cibo contenente sostanze tossiche, come l'ingestione di tossine naturalmente presenti negli alimenti (tossine endogene come ad esempio saxitossine nei molluschi), o prodotte durante la conservazione (tossine esogene come ad esempio aflatossine e ocratossine prodotte da muffe del genere *Aspergillus*). Anche additivi o contaminanti alimentari possono determinare reazioni tossiche; in generale i sintomi tipici interessano il Sistema Nervoso Centrale dando origine a cefalee, allucinazioni e patologie epatiche ed ematiche (3).

Le *non toxic food reactions*, nelle quali sono incluse le allergie alimentari, dipendono invece da specifiche caratteristiche fisiologiche dell'ospite e quando non sono mediate dal sistema immunitario sono definite intolleranze alimentari. In questi casi la causa dell'intolleranza potrebbe essere un difetto enzimatico o l'effetto di sostanze con attività farmacologica presenti nel cibo. L'intolleranza più comune è quella al lattosio, il cui assorbimento è permesso dall'azione dell'enzima β -galattosidasi che scinde il legame β -1,4 fra Glucosio e Galattosio; l'inattività di tale enzima non permette l'idrolisi del Lattosio che raggiunge intatto l'intestino e viene degradato dalla microflora autoctona, causando fenomeni quali meteorismo, dolore addominale e talvolta diarrea. Le intolleranze alimentari di tipo farmacologico colpiscono invece soggetti particolarmente sensibili a sostanze farmacologiche vasoattive (ad esempio istamina nei pesci sgombroidi e tiramina nei formaggi stagionati); in particolare l'istamina è il mediatore chimico delle reazioni allergiche, per cui si ritiene che l'ingestione di alimenti contenenti elevate quantità di istamina o alimenti istamino-liberatori (ad esempio latte, fragole, cioccolato, pomodoro, patate, pesce, ecc) possa provocare sintomi simili a quelli di una reazione allergica (4).

1.2. Meccanismi immunitari dell'allergia alimentare

Le reazioni allergiche sono risposte anomale del sistema immunitario verso sostanze generalmente definite come innocue. Nella patogenesi di questo tipo di reazioni avverse gli anticorpi della classe IgE vengono prodotti con funzione protettiva dai Linfociti B e successivamente almeno due molecole di anticorpi si legano, attraverso il loro sito localizzato nella regione Fab, ad una regione specifica degli allergeni denominata epitopo. La fase di legame delle IgE con le cellule immunitarie determina la loro sensibilizzazione; una seconda esposizione allo stesso epitopo scatena la reazione allergica. La fase di sensibilizzazione è asintomatica e può avvenire nel tratto gastrointestinale (allergia alimentare di classe I) o come conseguenza dell'inalazione di allergeni quali per esempio il polline (allergia alimentare di classe II) (5). Ad oggi sono comuni i casi di allergia alla frutta e verdura risultanti dalla sensibilizzazione primaria ad allergeni inalati come i pollini; individui sensibilizzati ad esempio verso il maggior allergene del polline di betulla (Bet v 1), producono anticorpi IgE in grado di riconoscere e legare proteine allergeniche omologhe presenti in frutta e verdura (6). A riguardo proteine omologhe all'allergene Bet v 1 sono state individuate nei frutti delle *Rosaceae* (Mela Mal d 1, ciliegia Pru av 1, albicocca Pru ar 1 e pera Pyr c 1) come nei legumi, frutta secca e semi (Nocciola Cor a 1, soia Gly m 4, arachide Ara h 8) (7-8). Questo fenomeno è stato definito come *Cross-reactive allergy syndrome* e non interessa solamente gli allergeni principali ma anche allergeni minori, portando così alla nascita del concetto di *panallergene*. Con riferimento alle allergie alimentari di classe I, l'ingestione di alimenti contenenti antigeni alimentari determina la presenza di quest'ultimi a livello del lume intestinale; attraverso il lume intestinale vengono catturati dalle cellule dendritiche APC (*Antigen-presenting cells*); quest'ultime hanno la funzione di internalizzare e processare gli antigeni alimentari in modo tale da renderli riconoscibili ai linfociti Th (immaturi). L'interazione fra il recettore antigenico dei linfociti T ed il complesso MHC (Complesso maggiore di istocompatibilità)-antigene presente sulle cellule APC, determina la differenziazione delle cellule Th immature in cellule mature, le quali a loro volta coadiuveranno i linfociti B nella loro differenziazione in plasmacellule e quindi nella produzione di immunoglobuline IgE. Le IgE prodotte entreranno nel circolo sanguigno dove si fisseranno alla membrana di cellule effettrici quali mastociti e basofili attraverso specifici recettori. Quindi una volta che un antigene alimentare ha stimolato la produzione di specifici anticorpi IgE, la successiva assunzione dello stesso

alimento è in grado di determinare una reazione antigene-IgE. In questa fase l'allergene interagirà con le IgE specifiche, fissate alla membrana e stimolerà mastociti e basofili a rilasciare sostanze farmacologicamente attive (processo di degranulazione) quali:

- istamina, prostaglandine e leucotreni;
- citochine incluse interleuchine (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6);
- fattori di attivazione piastrinica (PAF);
- altri mediatori che stimolano il rilascio tardivo di IgE.

La liberazione di queste sostanze responsabili dell'infiammazione determina vasodilatazione, contrazione della muscolatura liscia, stimolazione nervosa e secrezione di muco; la conseguente manifestazione sintomatologica può essere locale quando le reazioni IgE mediate sono legate all'azione di mastociti presenti a livello tissutale (superficie della pelle, mucose della bocca, intestino, ecc.) o sistemica per azione dei basofili.

Di seguito in Figura 2 è riportato uno schema riassuntivo delle reazioni allergiche IgE-mediate.

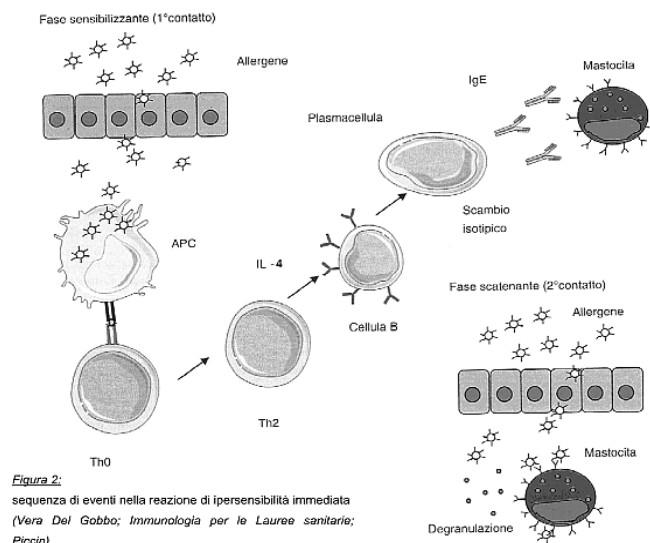


Figura 2: sequenza di eventi nella reazione di ipersensibilità immediata (Vera Del Gobbo; Immunologia per le Lauree sanitarie; Piccin).

Figura 2. Sequenza di eventi nella reazione allergica IgE mediata.

1.3. Metodi diagnostici per le allergie alimentari

Ad oggi differenti test possono aiutare nella diagnosi delle allergie alimentari, per esempio test allergologici *in vivo* (Skin Prick test, test di provocazione) ed a completamento test *in vitro* (RAST, EAST); in realtà l'approccio diagnostico ha inizio raccogliendo la completa storia clinica del paziente ed i sintomi e reazioni eventualmente osservati a seguito dell'ingestione

di un alimento. In effetti le allergie alimentari possono essere responsabili di una vasta sintomatologia che può coinvolgere la pelle, il tratto respiratorio e digerente. Per esempio le manifestazioni cliniche legate alla pelle sono in genere dermatiti e orticaria, mentre quelle legate al tratto gastrointestinale includono coliche, reflusso gastroesofageo, vomito, diarrea e costipazione (9).

I test cutanei quale SPT (Skin Prick Test) sono utili per effettuare uno screening di pazienti con sospetta allergia alimentare IgE mediata (10). Vi sono numerosi protocolli che delineano la procedura pratica per SPT; il protocollo proposto dall' *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology* si basa sull'osservazione di una reazione cutanea definita “*Wheal-and-flare*” a seguito dell'inoculo di una concentrazione di estratto purificato dell'allergene indagato. Al fine di aumentare la sensibilità sono state sviluppate delle varianti del SPT (*prick-to-prick test*) che utilizzano alimenti freschi quali frutta e verdura piuttosto che estratti commerciali. Il test SPT fornisce quindi informazioni riguardo la sensibilizzazione verso specifici alimenti ma non in maniera univoca a causa della presenza di numerosi falsi positivi; infatti un risultato positivo non prova necessariamente che l'alimento inoculato sia la causa della reazione avversa. In questo caso l'accuratezza del test risulta inferiore al 50% se paragonata a test di provocazione orale quale *Double-blind placebo-controlled food challenge* (DBPCFC) (11).

Fra i test diagnostici *in vivo* ritroviamo inoltre i test di provocazione orale (*Oral provocation test*) utili per la diagnosi di allergie IgE mediate e non IgE mediate e suddivisibili in:

- Open oral food challenge (sia il medico che il paziente conoscono la natura dell'alimento somministrato);
- Single-blind placebo-controlled food challenge (soltanto il medico conosce la natura dell'alimento);
- Double-blind placebo-controlled food challenge (il paziente riceve due somministrazioni, alimento e placebo, senza che nè il paziente nè il medico ne conoscano la natura).

In particolare il test Double-blind placebo-controlled food challenge mostra un'alta attendibilità e per questo è stato definito il *gold standard* nella diagnosi delle allergie alimentari (12).

I test diagnostici *in vitro* sono basati sul dosaggio di anticorpi IgE specifici verso un antigene presenti in un campione di sangue. Per esempio il RAST (RadioAllergoSorbent Test) e EAST

(EnzymeAllergoSorbent Test) sono test diagnostici in cui il siero del paziente viene incubato con allergeni specifici; la rilevazione degli anticorpi IgE legati agli antigeni alimentari avviene mediante l'impiego di anticorpi secondari anti IgE umane marcati. In questo caso le due tipologie di test differiscono unicamente per il metodo di rilevazione, il RAST prevede l'utilizzo di anticorpi secondari marcati con Radioisotopi mentre l'EAST è basato sull'impiego di anticorpi secondari marcati con enzimi.

Ad oggi al fine di implementare l'accuratezza e specificità dei test diagnostici, è stato introdotto il concetto di "*Component-resolved diagnosis*", che prevede da un lato la diagnosi di allergie alimentari verso i singoli allergeni, arginando quindi i problemi legati alla frequente cross-reattività di quest'ultimi e l'impiego di *array technologies* per la *detection* simultanea di IgE specifiche per un elevato numero di allergeni.

2.GLI ALLERGENI ALIMENTARI

2.1.Caratteristiche generali degli allergeni alimentari

Gli allergeni alimentari in genere sono proteine o glicoproteine a diverso peso molecolare, generalmente compreso fra 5 e 70 KDa, riconosciute dagli anticorpi presenti nell'organismo a seguito di sensibilizzazione primaria ed in grado di scatenare una specifica reazione immunologica (13). Numerosi allergeni alimentari possono causare reazioni quando ingeriti crudi, come nel caso di frutta e verdura, diversamente anche alimenti cotti o trattati industrialmente possono causare reazioni allergiche. Inoltre alcuni allergeni alimentari possono scatenare reazioni avverse se le proteine allergeniche vengono inalate; questo fenomeno è stato definito *cross-reactivity* e si verifica quando gli allergeni alimentari considerati hanno una struttura e sequenza simili per esempio agli allergeni del polline.

In ogni caso ogni alimento può potenzialmente indurre una risposta allergica, ad oggi sono stati registrati più di 170 alimenti diversi in grado di causare una reazione IgE mediata, fra i principali alimenti ritroviamo noci, noccioline americane, uova, latte, pesce, crostacei e molluschi, cereali e soia (13). Nei paesi europei gli alimenti allergenici identificati come significativi sono sedano, mostarda, sesamo, lupini e molluschi mentre il grano saraceno è risultato particolarmente comune in Giappone (14).

Le proteine allergeniche contenute in tali alimenti per essere definite *true food allergens*

devono necessariamente presentare precise caratteristiche quali:

- capacità di indurre il sistema immunitario a produrre IgE contro l'epitopo;
- capacità di legare le IgE prodotte in un individuo a seguito di sensibilizzazione primaria;
- capacità di scatenare una reazione allergica che si manifesta con differente sintomatologia.

Inoltre è possibile suddividere gli allergeni alimentari in *class I food allergens* e *class II food allergens*. Nella prima tipologia di allergeni ritroviamo caratteristiche comuni quali stabilità alla digestione gastrica ed al trattamento termico; quindi sono in grado di indurre sensibilizzazione primaria nel tratto gastrointestinale ed in genere sono responsabili di reazioni sistemiche gravi. Diversamente gli allergeni di classe II sono sensibili al calore ed agli enzimi digestivi, altamente omologhi alle proteine allergeniche del polline, ed in grado di indurre sensibilizzazione per inalazione. In questo caso gli anticorpi IgE specifici per allergeni presenti nel polline riconoscono gli epitopi di proteine omologhe presenti negli alimenti di origine vegetale (15); inoltre la manifestazione clinica osservata è caratterizzata da sintomi moderati. Tuttavia non è sempre possibile distinguere fra allergeni di I e II classe; per esempio l'estrema stabilità termica e resistenza alla digestione collocano le LTPs fra i più potenti allergeni di classe I; per contro è stato osservato un coinvolgimento delle LTPs del polline nella sensibilizzazione primaria in pazienti con anticorpi IgE specifici per LTP di artemisia e pesca (16).

Gli allergeni ad oggi noti sono stati definiti mediante nomenclatura, stabilita dalla *International Union of Immunological Societies (IUIS)* secondo la seguente designazione:

- prime tre lettere del genere di appartenenza;
- prima lettera della specie;
- un numero;

Per esempio Pru p 3 (*Prunus persica*).

Secondo il *WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee* vengono inoltre definiti *isoallergeni* molecole allergeniche provenienti dalla stessa specie, che presentano un peso molecolare simile, un'identica funzione biologica ed almeno il 67% di omologia nella

struttura primaria; nel caso in cui quest'ultima dovesse differire solo per alcuni amminoacidi si parlerebbe di *isoforma*.

Gli allergeni si dividono inoltre in *major allergens* e *minor allergens*: un allergene è considerato maggiore quando in più del 50% dei casi determina la reazione allergica, diversamente le proteine allergeniche che risultano determinanti in un numero limitato di casi vengono definite allergeni minori. Tale definizione è comunque legata al contesto in cui si manifesta la reazione allergica; per esempio Api g 1 rappresenta il maggior allergene in pazienti allergici al sedano provenienti dalla Svizzera, mentre pazienti ugualmente allergici, ma provenienti dalla Francia, sono raramente sensibilizzati verso Api g 1.

2.2.Determinanti di allergenicità

Le allergie alimentari, in particolare le allergie ad alimenti di origine vegetale, rappresentano un complesso insieme di reazioni avverse spesso influenzate da una moltitudine di fattori; per esempio le proprietà intrinseche degli allergeni sembrano influenzare l'allergenicità, il potenziale di sensibilizzazione e la gravità della manifestazione clinica. Ad oggi gli allergeni alimentari noti mostrano una notevole eterogeneità delle proprietà fisico-chimiche quali per esempio peso molecolare, punto isoelettrico, idrofobicità e stabilità e sono stati oggetto di numerosi studi al fine di identificare caratteristiche univoche responsabili dell'allergenicità di alcune proteine.

Inoltre fattori geografici, abitudini alimentari locali e particolari lavorazioni degli alimenti contribuiscono alla complessità del fenomeno dell'allergia alimentare; per esempio nell'area mediterranea le LTPs sono considerate allergeni maggiori dei frutti appartenenti al genere *Rosaceae* (17), diversamente in Nord Europa ed Europa centrale l'allergia alle *Rosaceae* è associata a pollinosi da betulla e sensibilizzazione verso l'allergene Bet v 1 e non alle LTPs (18). In genere gli allergeni che provocano reazioni allergiche di tipo I sono principalmente proteine e glicoproteine; la struttura primaria di una proteina consente di predirne le proprietà fisicochimiche e la stabilità. Analisi computazionali hanno infatti mostrato che la maggioranza dei *major allergen* sono proteine relativamente piccole, caricate negativamente, con una bassa idrofobicità e altamente stabili (19). Inoltre eventuali modificazioni post-traduzionali come glicosilazione o presenza di ponti disolfuro, possono incrementare la stabilità e biodisponibilità degli allergeni (20). Studi condotti negli ultimi anni hanno

effettivamente definito alcune importanti caratteristiche che potrebbero influenzare il potenziale allergenico di una proteina quali attività biologica, caratteristiche fisico-chimiche superficiali e *pattern* di glicosilazione (21). Numerose proteine allergeniche possiedono un'attività biologica intrinseca, sono per esempio proteasi, pectato-liasi, inibitori della tripsina, *calcium-binding protein* e *lipid transfer protein*; è noto che alcune di queste attività biologiche possono contribuire a conferire allergenicità aumentando per esempio la distribuzione tissutale dell'allergene mediante digestione della matrice extracellulare (attività ialuronidasi), la degradazione di molecole per l'adesione cellulare (allergene Der p 1 dell'acaro della polvere). Altri allergeni quale per esempio il maggior allergene del polline di betulla Bet v 1 agisce come *membrane-binding protein* legandosi ai fosfolipidi di membrana a livello della barriera mucosale, accedendo più agevolmente alle APC (*Antigen presenting cells*). Un chiaro esempio di come il ruolo biologico di una proteina allergenica possa influenzarne l'allergenicità è rappresentato dal maggior allergene dell'acaro della polvere *Der p 1*. Quest'ultimo è in grado di frammentare molecole poste sulla superficie cellulare come CD23 delle cellule B. È stato dimostrato che tale molecola ed i suoi frammenti solubili sono coinvolti nella regolazione delle immunoglobuline IgE; in condizioni fisiologiche il legame delle IgE alla molecola CD23 trasmette un segnale di regolazione negativa alle cellule B, ovvero quando CD23 non risulta legato alle IgE subisce proteolisi originando frammenti solubili in grado di regolare positivamente o negativamente la sintesi delle immunoglobuline. In particolare l'allergene *Der p 1* possiede l'abilità di proteolizzare la molecola CD23, liberando un frammento di 25 kDa che è in grado di regolare positivamente la produzione di IgE (22). Come detto precedentemente quando si considerano le proprietà chimico-fisiche degli allergeni gli aspetti importanti riguardano il peso molecolare, il punto isoelettrico, l'idrofobicità e stabilità; il peso molecolare per esempio influenza la capacità degli allergeni di infiltrarsi nella mucosa gastrointestinale ed interagire con il sistema immunitario, in effetti la maggior parte degli allergeni ha un peso molecolare relativamente basso compreso generalmente fra 5 e 70 kDa.

Un importante determinante di allergenicità è la stabilità della proteina allergenica; con il termine stabilità si intende l'abilità di una proteina di mantenere la sua struttura tridimensionale originaria a seguito di trattamenti chimici o fisici, così come trattamenti con proteasi. Ad oggi non sono stati individuati motivi strutturali associati alla stabilità di proteine allergeniche; solo alcune indicazioni suggeriscono come proteine termostabili siano

generalmente più piccole ed abbiano una maggior propensione ad adottare strutture beta (23). Un'altra caratteristica strutturale chiaramente legata al concetto di stabilità è la presenza di ponti disolfuro; in generale sia i legami disolfuro intramolecolari ed intermolecolari irrigidiscono la struttura terziaria limitando o rendendo reversibili eventuali perturbazioni della struttura dovute al calore o ad agenti chimici. Fra gli allergeni alimentari noti caratteristici per la presenza di ponti disolfuro ritroviamo i membri della superfamiglia delle prolammine (nsLTPs, Albumine 2S, inibitori della tripsina e α -amilasi), che nel complesso esibiscono termostabilità e resistenza a pH estremi e proteolisi. Come citato precedentemente stabilità significa anche resistenza ai trattamenti termici, quindi la capacità di *refolding* della proteina allergenica a seguito di cottura ad alte temperature ed il mantenimento della reattività immunologica; per esempio la LTP allergenica del mais è in grado di mantenere la capacità di legare anticorpi IgE specifici a seguito di cottura a 100°C per 160 minuti (24). Un ulteriore aspetto legato alla stabilità è rappresentato dalla capacità di alcune proteine allergeniche di superare l'ambiente del tratto gastrointestinale, caratterizzato da pH estremamente acidi ed enzimi proteolitici, in una conformazione ancora immunoattiva; tale resistenza è evidenziabile attraverso esperimenti di esposizione a *simulated gastric fluid* (SGF).

Alcune proteine extracellulari, compresi numerosi allergeni alimentari subiscono modificazioni post-traduzionali quali la glicosilazione; questo tipo di modificazione sembra avere implicazioni a livello della reattività immunologica dell'allergene e l'attività di anticorpi IgE specifici per la porzione glicosidica (*CCD-Cross-reactive carbohydrate determinants*) di glicoallergeni è stata studiata per lungo tempo (25-26). Gli anticorpi IgE specifici (sIgE) sono frequentemente presenti nel siero di pazienti affetti da allergia alimentare o pollinosi, almeno il 20% di pazienti allergici a carote, pomodoro e sedano sviluppano anticorpi IgE specifici per la porzione glicosidica (27-28). Nella patata e nel pomodoro sono noti alcuni glicoallergeni, per esempio l'allergene Lyc e 2 (β -fruttofuranosidasi o invertasi) è registrato come glicoallergene nel database ufficiale del World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS), sebbene sia noto che varie glicoproteine del pomodoro sono in grado di reagire con sIgE (per esempio poligalatturonasi 2A, perossidasi e pectina metil esterasi) (29-30).

2.3. Effetti del *food processing*

Il problema delle allergie alimentari ha continuato a ricevere molta attenzione e nel corso degli anni è diventato sempre più importante. Oggi i consumatori sono consapevoli e sono maggiormente informati riguardo gli alimenti contenenti potenziali allergeni; soprattutto considerando che sono numerosi i casi di intolleranza di individui allergici non solo verso gli alimenti tal quali ma anche verso gli alimenti trasformati. Infatti sono numerosi gli studi effettuati al fine di comprendere le modificazioni della reattività immunologica di proteine allergeniche sottoposte a processi tecnologici quali per esempio i trattamenti termici; è stato quindi confermato che tali trattamenti sono in grado di alterare la struttura tridimensionale delle proteine influenzando le proprietà allergeniche degli alimenti (31). In particolare le regioni che reagiscono con gli anticorpi specifici, denominate epitopi, possono essere distrutte o generate (*neoallergen formation*) a seguito di un riarrangiamento conformazionale della proteina; per esempio gli epitopi conformazionali tendono ad essere distrutti a seguito di trattamenti che vanno a denaturare la struttura ripiegata della proteina. Tipicamente la perdita della struttura tridimensionale è seguita dal fenomeno di *unfolding* reversibile, mentre la perdita della struttura secondaria (70-80°C) può portare alla formazione di nuovi legami intra/intermolecolari, riarrangiamenti dei ponti disolfuro (80-90°C) e formazione di aggregati (90-100°C) (32). Quindi gli epitopi conformazionali sono maggiormente suscettibili alla distruzione nelle condizioni del *food processing*, rispetto agli epitopi lineari presenti nella stessa proteina allergenica; quest'ultimi infatti vengono unicamente alterati attraverso idrolisi e possono essere distrutti per via chimica.

Inoltre in matrici più complesse contenenti zuccheri, sono comuni reazioni chimiche quali reazioni di Maillard ed imbrunimento enzimatico e quindi è possibile l'incremento o la diminuzione dell'allergenicità di un alimento. Per esempio sono stati condotti alcuni studi *in vitro* al fine di valutare la capacità di legame di proteine allergeniche ad anticorpi IgE specifici durante i trattamenti termici o con reazioni di imbrunimento in corso; in alcuni casi, la glicosilazione degli allergeni è in grado di incrementare la loro reattività immunologica, sebbene altri studi dimostrino che la glicosilazione non ha effetti o addirittura diminuisce la capacità di legame ad anticorpi IgE specifici (33-34). Per esempio sottoponendo a trattamento termico (100°C per 90 minuti) la proteina allergenica Ara h 2 è stato osservato un lieve aumento della capacità di legare anticorpi IgE specifici, che è risultata ulteriormente

incrementata dalla presenza di zuccheri quali glucosio, maltosio e ribosio (35).

La comprensione dei fenomeni legati alla modificazione della reattività immunologica di proteine allergeniche causati da trattamenti tecnologici può quindi aiutare a fornire maggiori informazioni riguardo il rischio legato al consumo di alimenti allergenici e quindi un valido strumento nella gestione dell' *allergenic risk of foods* (36).

2.4. Panallergeni e cross-reattività

Ad oggi il numero di individui allergici mono sensibilizzati verso un singolo allergene di origine vegetale è estremamente limitato, infatti la maggior parte dei pazienti sembra manifestare reazioni avverse a seguito di contatto o ingestione di molteplici allergeni da fonti vegetali diverse. Sostanze diverse, aventi un determinante antigenico comune, possono provocare sensibilizzazione allergica e reazioni crociate; un individuo allergico ad una proteina allergenica che contenga un determinante allergenico (epitopo) risulta potenzialmente reattivo nei confronti di altre sostanze che contengono lo stesso determinante. Si definisce quindi panallergene (dal greco *pan* che significa 'tutto') una proteina allergenica presente in campioni di origine differente e non necessariamente correlati. Nonostante l'appartenenza di queste sostanze allergeniche a famiglie diverse, la condivisione di regioni altamente conservate nella sequenza aminoacidica e nella struttura tridimensionale comporta una propensione a reazioni crociate.

Ad oggi i panallergeni noti comprendono varie famiglie fra le quali profiline, polcalcine e *non specific lipid transfer protein* (nsLTP).

Le profiline rappresentano una famiglia di piccole proteine (12-15 KDa), dotate di una sequenza ed una struttura altamente conservate, ubiquitarie e considerate responsabili di numerose reazioni crociate fra allergeni inalanti ed allergeni alimentari. Ad oggi sono state identificate profiline allergeniche nel polline di varie piante, alimenti di origine vegetale e persino latex (37). Le polcalcine sono un gruppo di allergeni appartenenti alla famiglia delle *calcium-binding proteins* (CBP); queste proteine costituiscono la maggior parte delle CBPs allergeniche e la loro reattività immunologica sembra essere espressa unicamente nei pollini. Nonostante la diversità strutturale e immunologica, in generale le polcalcine possono essere definite allergeni altamente cross reattivi, espressi specificatamente nei tessuti dei pollini; per tale ragione la sensibilizzazione a queste proteine allergeniche non è associata ad allergia

alimentare. Infine le *non specific lipid transfer protein* (nsLTP) costituiscono una famiglia di piccole proteine (7-9 KDa) ampiamente distribuite nel regno vegetale. Le nsLTP appartengono alla classe di proteine definite *Pathogenesis-related proteins* (PR), ed oltre ai numerosi ruoli biologici attribuiti, sembrano essere coinvolte in meccanismi di difesa della pianta grazie alle loro proprietà antibatteriche ed antifungine. Dal punto di vista immunologico sono state identificate nsLTPs nei pollini, in alimenti di origine vegetale e nel latex. In generale le nsLTPs sono i maggiori allergeni associati a reazioni crociate nella maggior parte degli alimenti di origine vegetale così come nel polline di varie piante. La sensibilizzazione alle nsLTPs è caratterizzata da differenze geografiche e spesso associata a manifestazioni allergiche con sintomi gravi. Generalmente pazienti che presentano anticorpi IgE specifici per nsLTP di *Rosaceae* tollerano frutti privati della buccia, tessuto vegetale nel quale è stata osservata una loro maggior espressione, ed alcuni vegetali quali carota, patata, banana e melone, ma sono a rischio di sviluppare reazioni avverse a seguito di ingestione di noci, nocciole ed arachidi.

Nonostante quindi la varietà ed eterogeneità degli allergeni, spesso è possibile evidenziare alcuni motivi strutturali responsabili della risposta allergica; la cross-reattività è infatti largamente determinata dalle caratteristiche strutturali degli allergeni: due proteine sono cross-reattive soltanto se presentano strutture superficiali conservate accessibili agli anticorpi, anche se esistono delle eccezioni come nel caso dei glicoallergeni. Proteine allergeniche cross-reattive hanno un ripiegamento simile, mentre proteine con ripiegamento simile non sono necessariamente cross-reattive.

2.5. Aspetti legislativi

Il regolamento UE n.1129/2011 emesso il 25 Ottobre 2011 contiene le linee guida relative alle informazioni riguardanti i prodotti alimentari da fornire ai consumatori; ha quindi l'obiettivo di rendere consapevoli i consumatori dei prodotti commercializzati nell'Unione Europea. Secondo tale regolamento tutti gli ingredienti, sostanze o prodotti utilizzati nella produzione di alimenti o presenti in quest'ultimi possono provocare allergie o intolleranze in alcune persone, e di conseguenza possono mettere a rischio la salute delle persone coinvolte. Di conseguenza è essenziale fornire informazioni sulla presenza di additivi alimentari, coadiuvanti tecnologici ed altre sostanze con effetti allergenici o di intolleranza

scientificamente dimostrati o prodotti, in modo da consentire ai consumatori di effettuare scelte consapevoli per la loro sicurezza.

Il provvedimento nazionale che ha di fatto recepito queste linee guida e introdotto specifiche normative relative agli allergeni è stato il Decreto Legislativo 114/2006 (attuazione Direttive Europea 2003/89/CE, 2004/77/CE, 2005/63/CE in materia di indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari). Questo Decreto Legislativo obbliga i produttori ad indicare qualsiasi ingrediente contenuto in percentuale non inferiore al 5%; inoltre è obbligatorio riportare la dicitura “*contiene...*” per tutti gli ingredienti considerati allergenici a meno che non siano già riportati, con il loro nome specifico, nell'elenco degli ingredienti o nella denominazione di vendita.

Nonostante gli obblighi imposti, resta comunque il rischio associato alla possibile presenza in tracce di ingredienti allergenici negli alimenti, per esempio dovuto all'utilizzo della stessa linea di produzione per prodotti diversi (*cross-contact*). Considerata quindi l'impossibilità di garantire l'assenza in un prodotto alimentare di un determinato allergene, è possibile utilizzare in etichetta la dicitura “*Prodotto in uno stabilimento che utilizza anche...*” (38).

Di seguito si riporta un elenco aggiornato delle sostanze o prodotti allergenici per i quali sussiste l'obbligo di indicazione in etichetta.

SOSTANZE O PRODOTTI CHE PROVOCANO ALLERGIE O INTOLLERANZE

1. Cereali contenenti glutine, cioè: grano, segale, orzo, avena, farro, kamut o i loro ceppi ibridati e prodotti derivati, tranne:
 - a) sciroppi di glucosio a base di grano, incluso destratto (!);
 - b) maltoestrine a base di grano (!);
 - c) sciroppi di glucosio a base di orzo;
 - d) cereali utilizzati per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola.
2. Crostacei e prodotti a base di crostacei.
3. Uova e prodotti a base di uova.
4. Pesce e prodotti a base di pesce, tranne:
 - a) gelatina di pesce utilizzata come supporto per preparati di vitamine o carotenoidi;
 - b) gelatina o colla di pesce utilizzata come chiarificante nella birra e nel vino.
5. Arachidi e prodotti a base di arachidi.
6. Soia e prodotti a base di soia, tranne:
 - a) olio e grasso di soia raffinato (!);
 - b) tocoferoli misti naturali (E306), tocoferolo D-alfa naturale, tocoferolo acetato D-alfa naturale, tocoferolo succinato D-alfa naturale a base di soia;
 - c) oli vegetali derivati da fitosteroli e fitosteroli esteri a base di soia;
 - d) estere di stanol vegetale prodotto da steroli di olio vegetale a base di soia.
7. Latte e prodotti a base di latte (incluso lattosio), tranne:
 - a) siero di latte utilizzato per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola;
 - b) lattolo.
8. Frutta a guscio, vale a dire: mandorle (*Amygđalu carolinensis* L.), nocciole (*Corylus avellana*), noci (*Juglans regia*), noci di acagiú (*Anacardium occidentale*), noci di pecan [*Carya illinoensis* (Wiegand) K. Koch], noci del Brasile (*Brazilia eculeata*), pistacchi (*Pistacia terebinthifera*), noci macadamia o noci del Queensland (*Macadamia ternstroemia*), e i loro prodotti, tranne per la frutta a guscio utilizzata per la fabbricazione di distillati alcolici, incluso l'alcol etilico di origine agricola.
9. Sclamo e prodotti a base di sclamo.
10. Semppe e prodotti a base di semppe.
11. Semi di sesamo e prodotti a base di semi di sesamo.
12. Amidi sulfonati e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg/kg o 10 mg/litro in termini di SO₂ totale da calcolarsi per i prodotti così come proposti pronti al consumo o ricostituiti conformemente alle istruzioni dei fabbricanti.
13. Lupini e prodotti a base di lupini.
14. Molluschi e prodotti a base di molluschi.

Figura 3. Elenco degli ingredienti allergenici che devono figurare obbligatoriamente in etichetta (Allegato III bis della direttiva 2003/89/CE e aggiornamento direttiva 2006/142 recepita a livello nazionale con Dlgs 178/2007).

2.6. Epitopi per cellule B

Il termine epitopo, coniato da Niels Jerne nel 1960 (39), fa riferimento al determinante antigenico o componente di una molecola riconosciuto dagli anticorpi; in particolare sono definiti *B cell epitopes* quelli che interagiscono con la regione FAB (*Fragment antigen binding region*) degli anticorpi IgE. Tale regione è composta da sequenze di aminoacidi, in particolare da un dominio costante ed uno variabile della catena pesante e leggera dell'anticorpo (Figura 4); le sequenze variabili conferiscono specificità e risultano quindi responsabili per il riconoscimento di epitopi specifici.

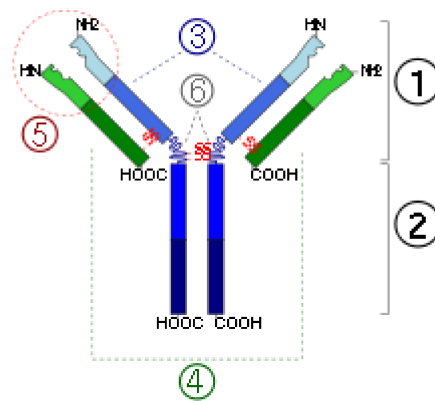


Figura 4. 1) FAB region. 2) Fc region 3) Heavy chain (blue) with one variable domain followed by a constant domain, a hinge region, and two more constant domains. 4) Light chain (green) with one variable and one constant domain. 5) Antigen binding site. 6) Hinge regions.

In primo luogo sussiste una differenza importante fra *B cell epitopes* and *T cell epitopes* e la loro localizzazione all'interno della molecola allergenica non coincide necessariamente; i *T cell epitopes* sono unicamente lineari e quindi risultano distribuiti a livello della struttura primaria dell'allergene, diversamente i *B cell epitopes* sono riconosciuti dalle immunoglobuline IgE e possono essere sia lineari che conformazionali. Gli epitopi lineari (anche conosciuti come "epitopi continui") coinvolgono quindi sequenze amminoacidiche consecutive riconosciute dalla regione variabile dell'anticorpo (regione N-terminale del frammento FAB). Gli epitopi conformazionali o discontinui sono caratterizzati da combinazioni di aminoacidi non adiacenti nella struttura primaria ma distribuiti in prossimità di determinate regioni dell'allergene stesso, quindi derivano dalla struttura tridimensionale della proteina allergenica.

Con riferimento agli allergeni alimentari, in alcuni casi gli epitopi possono non risultare accessibili quando la molecola allergenica è correttamente ripiegata, mentre trattamenti tecnologici o la digestione possono portare ad un'alterazione del *fold* della proteina e quindi un'esposizione degli epitopi nascosti. Per esempio gli epitopi di riconoscimento per anticorpi IgE della proteina trimerica Ara h 1 sono localizzati nelle aree di interazione dei tre monomeri, quindi si è pensato che la struttura trimerica dell'allergene fosse in grado di proteggere gli epitopi da fenomeni di degradazione (40). Tuttavia se si considerano gli

allergeni alimentari associati a Sindrome Orale Allergica (*OAS-Oral Allergy Syndrome*) come gli allergeni omologhi a Bet v 1, la perdita della struttura tridimensionale a causa di denaturazione e digestione porta alla perdita di numerosi *B cell epitopes* (41).

Negli anni è stata quindi fondamentale l'individuazione e caratterizzazione di *B cell epitopes*, infatti la diffrazione ai raggi X o NMR di complessi di cristallizzazione antigene-anticorpo generalmente ha consentito di risolvere la struttura di interazione evidenziandone la differenza fra epitopi conformazionali e lineari. Oltre ai metodi empirici è frequente l'utilizzo di algoritmi in grado di predire l'allergenicità ed identificare epitopi conformazionali e sequenziali sulla base della composizione aminoacidica, delle proprietà strutturali della molecola (idrofobicità, antigenicità, mobilità, flessibilità, accessibilità,...) ed infine della struttura tridimensionale; tuttavia il *range* di accuratezza del metodo è 35-75%, quindi le strategie empiriche rimangono ad oggi quelle più precise. Fra quest'ultime le tecniche di mappatura degli epitopi sono basate sul riconoscimento da parte di anticorpi IgE di:

- peptidi sintetici derivanti dalla sequenza lineare dell'allergene;
- piccoli frammenti di allergene espressi in forma ricombinante o risultanti dalla digestione proteica;
- *immunoblotting* di proteine allergeniche non ripiegate.

Sebbene queste tecniche siano utili principalmente per il riconoscimento di epitopi lineari, nella maggior parte degli alimenti allergenici indagati è stato possibile individuare un'associazione fra l'interazione con epitopi lineari e gravità della manifestazione allergica.

Con riferimento alle proteine allergeniche globulari come per esempio gli allergeni inalanti, o gli allergeni alimentari associati a Sindrome Orale Allergica, queste tecniche presentano un'importante limitazione ovvero di non essere in grado di identificare epitopi conformazionali (42). A tale scopo sono vari gli approcci identificati e basati sulla struttura delle proteine allergeniche, tuttavia ad oggi l'unico metodo che può determinare la struttura completa di un epitopo è la preparazione di un complesso fra il frammento FAB di un anticorpo IgE monoclonale e l'allergene, la cristallizzazione del complesso e determinazione della struttura, risolvendo quei determinanti riconosciuti dalle CDR (*Complementary Determining Regions*) dell'anticorpo sulla proteina nativa (43).

3.ALLERGENI RICOMBINANTI

3.1.Aspetti generali

Negli ultimi 25 anni le tecniche di clonaggio molecolare hanno consentito l'isolamento delle regioni di cDNA codificanti per allergeni di varie fonti vegetali, e quindi la produzione in forma ricombinante degli allergeni (44). La disponibilità di allergeni ricombinanti ha permesso lo studio dei meccanismi patogenetici associati alle allergie, utilizzando le proteine allergeniche prodotte, direttamente in pazienti allergici. Ad oggi sono stati sviluppati test diagnostici *in vivo* ed *in vitro* basati sull'impiego di allergeni, epitopi e peptidi ricombinanti, utili a fornire una diagnosi precisa del fenomeno allergico ed a fornire informazioni riguardo la risposta immunologica durante il trattamento.

La produzione di allergeni ricombinanti richiede, in una prima fase, l'estrazione di mRNA dalla fonte alimentare allergenica, che verrà a sua volta retrotrascritto ad DNA. La realizzazione di librerie a cDNA consente attraverso tecniche di PCR lo *screening*, isolamento e successivo clonaggio di sequenze codificanti per l'allergene; di conseguenza con l'isolamento del frammento codificante per la proteina di interesse ed il suo inserimento in un vettore appropriato, il DNA potrà essere propagato, usato per l'analisi della sequenza e clonato in un costrutto idoneo a promuovere la sintesi dell'allergene nel microorganismo ospite.

Ad oggi numerosi allergeni sono stati prodotti in forma ricombinante mediante sistemi di espressione procariotica quali *E.coli*, "mimando" completamente le proprietà molecolari dell'allergene naturale inclusa la capacità di legare anticorpi IgE specifici (45). La maggior parte delle proteine allergeniche alimentari deriva da fonti vegetali, di conseguenza è emerso che i sistemi di espressione procariotici non risultano adeguati per le modificazioni post traduzionali specifiche; quindi sistemi di espressione eucariotici quali lieviti, piante e mammiferi hanno permesso la produzione di proteine allergeniche con più alte rese di espressione, con il corretto ripiegamento e con una procedura di purificazione più semplificata. In un recente studio è stato espresso con successo il maggiore allergene del polline di *Artemisia vulgaris* in piante di tabacco ed in colture di cellule vegetali della pianta di tabacco (46); in effetti il *Molecular pharming*, paragonato ai sistemi di espressione sopraccitati, presenta svariati vantaggi: potenziale produzione di biomasse *low cost* ed in

larga scala, rischio ridotto di contaminazioni (virus dei mammiferi, prioni, oncogeni o tossine batteriche), ripiegamento corretto della proteina prodotta, modificazioni post-traduzionali e assemblamento di proteine multimeriche, costi di processo ridotti, produzione simultanea di molteplici proteine ed infine una maggior accettazione dal punto di vista etico da parte della società (47).

Oltre ai fini diagnostici e terapeutici la produzione ricombinante di allergeni ha permesso, mediante l'analisi di sequenza, di individuare omologie fra proteine anche appartenenti a famiglie diverse; esperimenti *in vitro* hanno invece consentito di dimostrare fenomeni di cross-reattività fra allergeni omologhi, fornendo quindi maggiori informazioni riguardo i casi clinici di pazienti allergici al polline che mostravano reazioni avverse a seguito dell'ingestione di alimenti vegetali. Inoltre la disponibilità di allergeni ricombinanti ha consentito lo studio approfondito degli aspetti strutturali, funzionali di quest'ultimi; tecniche quali cristallografia a raggi X e spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) hanno permesso di risolvere la struttura dimensionale e quindi prevedere il potenziale allergenico della proteina.

3.2. Applicazioni diagnostiche e terapeutiche

La produzione di allergeni ricombinanti trova un ampio impiego nella CRD (*Component-resolved allergy diagnosis*), introducendo la possibilità di definire precisi *patterns* di sensibilizzazione, correlandoli alla manifestazione clinica ed analizzandone la distribuzione geografica. Infatti le tecniche tradizionali prevedevano l'utilizzo di allergeni estratti direttamente dalle fonti naturali, costituiti spesso da una miscela di componenti allergenici, difficilmente standardizzabili. Inoltre l'impiego in diagnostica di allergeni naturali estratti implicava la presenza di allergeni variabili in quantità e qualità ed in proprietà allergeniche, e quindi inadeguati a definire profili di sensibilizzazione del paziente verso un singolo componente allergenico. Gli allergeni ricombinanti trovano applicazione nei test diagnostici *in vivo* quali *SPTs* (*Skin prick tests*), che ad oggi risultano estremamente efficaci nell'inquadrare un paziente non più come soggetto allergico ad una determinata fonte ma ad uno o più allergeni specifici (48). Recentemente sono state introdotte nel campo della ricerca immunologica le *microarray technologies* come strumento per la valutazione simultanea della reattività di specifici anticorpi IgE verso numerose componenti allergeniche. Consiste nella deposizione di ridotte quantità di molecole allergeniche ricombinanti in pozzetti posti su un

vetrino (*chip*) successivamente incubato con il siero del paziente allergico (circa 20 μ l); le IgE legate all'allergene immobilizzato vengono rilevate con un anticorpo secondario anti IgE umane marcato con una sonda fluorescente, ed il segnale viene acquisito mediante l'impiego di un apposito laser scanner (Figura 5). Uno studio recente condotto sugli allergeni della gomma di latex (Hev b 1-13), elastomero naturale estratto dall'albero tropicale *Hevea brasiliensis* ha permesso di caratterizzare il profilo di sensibilizzazione di pazienti allergici al latex verso ogni singolo componente allergenico (49). Inoltre tale studio ha dimostrato che questa tecnica utilizza volumi minimi di siero dei pazienti, definendosi uno strumento diagnostico non invasivo, e potenzialmente utile per la caratterizzazione dei pazienti allergici alla gomma di latex ma che manifestano fenomeni di cross-reattività verso alimenti di origine vegetale.

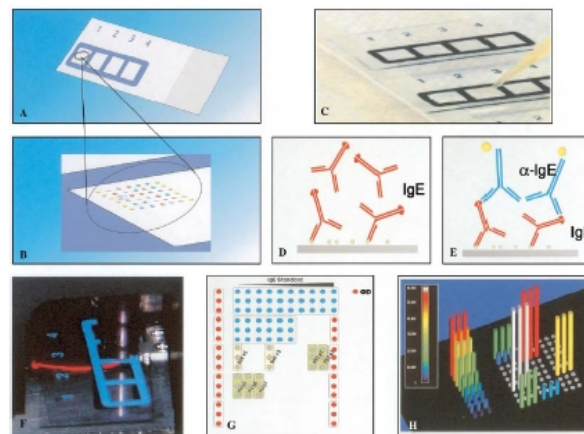


Figura 5. Diagnosi delle allergie basata sull'uso di chip (microarray).

Un'altra applicazione degli allergeni ricombinanti riguarda l'uso terapeutico, quindi l'immunoterapia come trattamento per modulare la risposta immunitaria allergene specifica; questa tipologia di terapia, a differenza della farmacoterapia che prevede la somministrazione di farmaci in grado di alleviare i sintomi, è antigene-specifica ed è volta alla cura dei disturbi allergici IgE mediati.

In generale la SIT (*Specific Allergen Immunotherapy*) convenzionale consiste in una fase di esposizione del paziente a crescenti quantità di allergene naturale fino ad una fase di mantenimento, al fine di desensibilizzare il soggetto o promuovere tolleranza; tuttavia esistono vari approcci immunoterapici basati sulla diversa manifestazione clinica associata all'allergia. Per esempio l'immunoterapia subcutanea (SCIT) è stata utilizzata con successo

nel trattamento delle allergie ad inalanti (asma e riniti allergiche), portando allo sviluppo di immunoterapie specifiche per l'allergia alimentare. Né la SCIT né successive strategie quali immunoterapia orale (OIT), immunoterapia sublinguale (SLIT) sono risultate totalmente efficaci nel trattamento delle allergie alimentari, in particolare a causa della variabilità di composizione degli estratti commerciali utilizzati e dell'alto rischio di reazioni sistemiche avverse. L'utilizzo di allergeni ricombinanti, sia che si tratti di proteine *wild-type* che proteine ipoallergeniche, ha consentito di disporre di formulazioni farmacologiche definite e perfettamente standard e di limitare i *side effects* associati all'immunoterapia. In particolare risultano di estremo interesse le proteine ricombinanti ipoallergeniche, quindi ingegnerizzate per ridurre la reattività immunologica specifica, attraverso mutagenesi sito-specifica delle regioni di legame per gli anticorpi IgE. Vengono quindi definiti 'derivati allergenici iporeattivi' gli allergeni ricombinanti modificati a livello dei *B cell epitopes*, ma che preservano gli epitopi per le cellule T e la capacità di indurre anticorpi IgG che riconoscono l'allergene *wild-type* ed allo stesso tempo bloccando il suo riconoscimento da parte delle IgE del soggetti allergici.

Ad oggi sono vari gli approcci di immunoterapia allergene specifica, sia basati sull'impiego di proteine allergeniche *wild-type* che iporeattive, e sono numerosi gli studi clinici condotti che indicano come gli allergeni ricombinanti possano garantire trattamenti sicuri e di alta qualità e sempre di più privi di reazioni avverse pericolose per il paziente.

4. ALLERGENI ALIMENTARI DI ORIGINE VEGETALE

È noto come gli alimenti di origine vegetale siano la causa maggiore di allergie alimentari, in particolar modo nei soggetti adulti, mentre questo fenomeno risulta meno frequente in età infantile (50). Inoltre la diffusione di queste allergie risulta associata alla presenza di determinati alimenti di origine vegetale nei vari paesi, alle abitudini alimentari locali ed all'esposizione ai pollini (51).

Ad oggi le proteine allergeniche identificate negli alimenti di origine vegetale sono numerose, nonostante questo è possibile ricondurle ad un numero limitato di famiglie e superfamiglie; inoltre la gran parte degli alimenti di origine vegetale responsabili di allergie appartiene alle seguenti famiglie botaniche: *Rosaceae* (mela, ciliegia, pesca, albicocca, pera, ecc.), *Solanaceae* (pomodoro, patata e melanzana), leguminose e cereali.

Considerata l'ampia varietà di allergeni alimentari nel regno vegetale, già negli anni passati si è voluto classificare queste proteine basandosi sulle caratteristiche strutturali e funzionali; inoltre la disponibilità di *tools* informatici ha consentito di sviluppare database in grado di raccogliere informazioni biochimiche, molecolari e cliniche di ogni allergene.

I criteri adottati per la classificazione prevedevano il raggruppamento di proteine allergeniche con un'identità minima del 30% nella stessa famiglia, mentre proteine con una più bassa identità di sequenza ma con funzioni biologiche e struttura tridimensionale simile, sono state riunite in superfamiglie. Il sistema di classificazione degli allergeni di origine vegetale è quindi in grado di fornire una base per lo studio delle proprietà strutturali e funzionali delle proteine allergeniche, soprattutto per la predizione di potenziali allergeni e fenomeni di cross-reattività. Numerose proteine allergeniche risultano infatti strutturalmente e funzionalmente omologhe anche se filogeneticamente lontane, questo ha determinato l'insorgenza di fenomeni di cross-reattività, in particolare è nota la *cross-reactivity* fra i pollini ed alimenti di origine vegetale.

Le principali superfamiglie identificate sono:

- Cupine, che comprende Globuline 7S (Viciline) e 11S (Legumine);
- Prolamine, che comprende Albumine 2S, nsLTPs, inibitori di α -amilasi/proteasi dei cereali e proteine di riserva dei cereali;
- Pathogenesis-related proteins (PRP) o superfamiglia di proteine omologhe al maggior allergene del polline di betulla Bet v 1.

Il numero di proteine allergeniche per le quali si dispone di informazioni di sequenza, strutturali e funzionali è in continuo aumento e sono varie le famiglie di proteine vegetali che pur possedendo marcate proprietà allergeniche non sono state incluse nella suddetta classificazione; di seguito riportiamo una panoramica generale delle superfamiglie e famiglie di proteine di origine vegetale dotate di proprietà allergeniche.

Cupine

Le cupine costituiscono una superfamiglia di proteine che condividono due sequenze consenso conservate ed un dominio centrale a β -barile (cupine a singolo dominio). Le bicupine, proteine dotate di due domini centrali conservati, comprendono le globuline (*seed*

storage proteins), componenti fondamentali della dieta dell'uomo, in particolare per la loro presenza nei legumi quali soia ed arachide. E' possibile suddividere le globuline in base al loro coefficiente di sedimentazione in: Viciline (Globuline 7S) e Legumine (Globuline 11S).

Le viciline costituiscono una classe di proteine particolarmente presente nei semi delle piante leguminose e non, rappresentano infatti circa il 70-80% delle proteine totali presenti nei semi di queste piante (52). Inoltre sono proteine trimeriche di circa 150-190 KDa, prive di cisteine e quindi di ponti disolfuro e dotate di una struttura tridimensionale a forma di disco; la vicilina allergenica maggiormente caratterizzata è il maggior allergene dell'arachide Ara h 1, proteina di circa 63 KDa caratterizzata da tre monomeri che uniti formano una struttura altamente stabile e resistente all'azione di proteasi e denaturazione. Inoltre la maggior parte dei *B cell epitopes* risulta collocata nella regione di interazione delle subunità, garantendo una protezione nei confronti della degradazione da parte di proteasi. Varie globuline 7S *Vicilin-type* sono state anche identificate nelle lenticchie, nella noce, negli anacardi e nei semi di sesamo.

Le legumine sono proteine esameriche inizialmente assemblate e trasportate attraverso il sistema secretorio sotto forma di trimeri intermedi e successivamente trasformati nella proteina esamerica matura. Proteine allergeniche quali Ara h 3 (allergene maggiore dell'arachide), Ber e 2 (allergene maggiore della noce brasiliana) e Cor a 9 (allergene maggiore della nocciola anche conosciuto come corilina) appartengono alla famiglia delle proteine di riserva legumine 11S (53); altre globuline 11S da alimenti allergenici sono state identificate nella noce di cocco e nella mandorla.

Prolamine

La superfamiglia delle prolamine è stata costituita a seguito della caratterizzazione delle prolamine dei cereali, le più abbondanti proteine di riserva dei cereali (eccetto per l'orzo ed il riso). Oltre alle prolamine dei cereali, questa superfamiglia comprende importanti proteine allergeniche appartenenti alle famiglie delle Albumine 2S, nsLTPs, inibitori dell' α -amilasi e tripsina dei cereali. Tali proteine sono a basso peso molecolare, ricche di cisteina e presentano una struttura tridimensionale caratterizzata principalmente da α -eliche.

Le albumine 2S sono largamente diffuse nei semi delle piante dicotiledoni e monocotiledoni,

sono eterodimeri costituiti da due catene polipeptidiche di circa 4 e 9 KDa; dal punto di vista strutturale sono caratterizzate da quattro α -eliche unite da quattro ponti disolfuro. Oltre alle funzioni di riserva e di difesa della pianta, le albumine 2S sono note per le proprietà allergeniche; numerosi allergeni dei semi e delle noci sono state classificate come albumine 2S, quali per esempio Ber e 1 della nocciola brasiliana, Jug r 1 della nocciola inglese e le albumine 2S degli anacardi (54).

La famiglia delle *Non specific Lipid Transfer Protein* (nsLTPs) è costituita da proteine monomeriche di peso molecolare rispettivamente di 7 KDa (nsLTP₂) e 9 KDa (nsLTP₁), caratterizzate dalla presenza di quattro ponti disolfuro intramolecolari. Le nsLTPs risultano resistenti alla proteolisi, condizioni estreme di pH e temperatura, essendo in grado di ripristinare il *fold* corretto a seguito del trattamento subito. In genere tali proteine si accumulano principalmente negli strati più esterni degli organi della pianta, incrementando così il potenziale allergenico della pelle dei frutti delle *Rosaceae*. Sono state isolate nsLTPs in frutta, noci, semi e verdure; fra i maggiori allergeni identificati nei suddetti alimenti ritroviamo per esempio Pru p 3 (maggior allergene della pesca), Mal d 3 (maggior allergene della mela), Pru ar 3 (maggior allergene dell'albicocca) (55).

Gli inibitori delle α -amilasi e proteasi dei cereali interferiscono con la digestione di amidi e proteine della pianta inibendo l'azione degli enzimi degli insetti; questa tipologia di inibitori è per esempio prodotta dal frumento, orzo, segale, riso e granoturco (56). Sono proteine costituite da subunità di 120-160 residui aminoacidici, contenenti quattro ponti disolfuro e presenti in natura sotto forma di monomeri, dimeri o tetrameri. Gli allergeni appartenenti a questa famiglia sono in grado di provocare reazioni avverse nei soggetti sensibili sia per inalazione che ingestione; l'allergene maggiormente caratterizzato appartenente a questo gruppo è l'inibitore di α -amilasi del riso (57).

Le prolamine dei cereali sono generalmente denominate gliadine e glutenine nel frumento, secaline nella segale, ordeine nell'orzo e costituiscono le principali proteine di riserva localizzate nell'endosperma del chicco dei cereali. Dal punto di vista strutturale sono caratterizzate da un dominio N-terminale contenente una regione ripetuta ricca in prolina e glutammina ed un dominio C-terminale con residui di cisteina che formano ponti disolfuro

intracatena (58). Le proteine che hanno mostrato una maggior reattività nei confronti degli anticorpi IgE sono glutenina a basso peso molecolare, α -gliadina e γ -gliadina (59); vari studi hanno evidenziato come la ω -5 gliadina (Tri a 19) sia la proteina responsabile di reazioni allergiche nei bambini a seguito dell'ingestione di prodotti a base di frumento (60).

Pathogenesis-related proteins (PRs)

Il sistema di difesa delle piante generalmente produce un'ampia varietà di composti e proteine in risposta a stress biotici ed abiotici (chimici, stress osmotici ed inquinamento dell'aria); in particolare le PRs sono proteine espresse specificatamente dalla pianta in risposta a infezioni di patogeni quali funghi, batteri o virus, o a condizioni ambientali avverse. In realtà le PRs non costituiscono una vera e propria superfamiglia ma includono famiglie proteiche non correlate ma coinvolte nel sistema di difesa delle piante. Ad oggi esistono varie famiglie di *pathogenesis-related protein*, in figura 6 sono riportate le principali famiglie.

COMUNI ALLERGENI ALIMENTARI		
Classificazione proteine	Proprietà	Sorgente allergica (allergene)
PR 2	B 1-3-Glucanasi	Frutti, vegetali
PR 3	Chitinasi di tipo 1 (basiche) e di tipo 2 (acide)	Avocado (Pers a 1), banana, castagno
PR 4	Chitinasi simili alla proteina patata Win	Rapa, Bacca di Sambuco
PR 5	Taumatina e osmotina (antifungine)	Ciliegia (Pru av 2), mela (Mal d 2), paprika
PR 6	Proteasi e inibitori di proteasi	Soia, grano, orzo, segale, riso
PR 9	Perossidasi	Grano, orzo
PR 10	Est v 1 omologhi simili a ribonucleasi	Mela (Mal d 2), ciliegia (Pru av 1), carota (Dau c 1), sedano (Api g 1), pera (Pyr c 1), Nocciola (Cor a 1), albicocca (Pru ar 1)
PR 14 Lipid transfer proteins	Metabolismo lipidico	Pesca (pru p 3), mela, albicocca, broccoli, carote

Figura 6. Classificazione delle Pathogenesis-related proteins.

Fra le PR-2 è stata identificata una β -1,3-glucanasi basica isolata nel lattice dell'albero naturale della gomma *Havea brasiliensis* (Hev b 2), rilevante allergene del lattice (61). l'associazione fra allergia al lattice ed ipersensibilità a cibi quali avocado, banana, kiwi, castagna e fichi è riconosciuta come *Latex-Fruits Syndrome*. Questo fenomeno di cross-reattività è conseguenza della presenza di proteine omologhe a Hev b 2 presenti nei suddetti frutti.

Un'altra famiglia rilevante è quella delle PR-5 ovvero delle *thaumatin-like proteins* (TLPs), di cui fa parte un'importante allergene della mela Mal d 2, responsabile di reazioni avverse associate all'allergia alla mela. Vari studi hanno consentito di produrre in forma ricombinante

l'allergene Mal d 2 utilizzando la pianta come sistema di espressione, e di evidenziarne le proprietà antifungine suggerendo così un suo coinvolgimento nel sistema di difesa della pianta (62).

La famiglia delle PR-10 è costituita dalle proteine omologhe al maggior allergene del polline Bet v 1. La maggior parte di queste proteine è stata isolata nei frutti delle *Rosaceae* e cross reagisce con l'allergene Bet v 1, determinando la più frequente sindrome clinica ovvero l'OAS (*Oral Allergy Syndrome*), manifestazione di allergia alimentare in pazienti che soffrono di pollinosi.

All'interno della superfamiglia delle PRs ritroviamo inoltre la famiglia delle *Kunitz-type protease inhibitors*, che comprende proteine dotate di attività inibitoria nei confronti di varie proteasi quali serine-proteasi, aspartato-proteasi. Sono largamente diffuse nei legumi ed in particolare è stato studiato l'inibitore della tripsina nella soia, considerato allergene minore benchè in grado di indurre reazioni sistemiche in soggetti allergici (63).

Inoltre due famiglie di proteasi quali *papain-like cysteine proteasi* e *subtilisin-like serine proteasi* comprendono varie proteine allergeniche; per esempio alla famiglia delle papaine appartiene Act c 1 il maggior allergene del kiwi, responsabile di reazioni IgE-mediate nel 90% dei pazienti allergici al kiwi (64). Diversamente l'unico membro appartenente alla famiglia delle subtilisine è la proteina allergenica Cuc m 1 del melone (*Cucumis melo*), che risulta IgE reattiva nella maggior parte dei pazienti allergici al melone (65).

Profiline

Le profiline sono proteine citosoliche presenti nelle cellule eucariotiche che interagiscono con la proteina monomerică actina e partecipano alla regolazione del processo di polimerizzazione dei filamenti di actina; in particolare nelle piante le profiline hanno un importante ruolo nel controllo della crescita dei microfilamenti di actina. Sono proteine di circa 12-15 kDa e presentano sequenze altamente conservate fra le varie specie botaniche, con una percentuale di identità pari a 70-85%. Le più note profiline allergeniche sono la profilina del polline di betulla e di *Hevea brasiliensis* latex; la loro sequenza conservata determina anche una struttura altamente simile. Sono infatti noti fenomeni di reazioni crociate fra profiline IgE specifiche e profiline del polline ed alimentari.

Generalmente le profiline sono sensibili ai trattamenti termici ed alla digestione gastrica, quindi la manifestazione allergica causata da tali proteine allergeniche è limitata alla

Sindrome Orale Allergica provocata dall'ingestione di alimenti crudi. Negli anni passati sono state caratterizzate numerose profiline allergeniche; ad oggi sono state per esempio identificate profiline nella pera (Pyr c 4), nella ciliegia (Pru av 4), nella pesca (Pru p 4) e nella nocciola (Cor a 2).

5. Non specific LIPID TRANSFER PROTEIN

5.1. Aspetti generali

Le *non specific Lipid transfer proteins* costituiscono una famiglia di piccole proteine largamente diffuse nel regno vegetale. Vengono così definite per la capacità comune di trasferire molecole lipidiche tra le membrane *in vitro*; in particolare sono definite aspecifiche per differenziarle per esempio dalle LTPs estratte da tessuti di mammiferi che mostrano un'elevata specificità verso i lipidi trasferiti. Nonostante siano state caratterizzate numerose LTPs in mammiferi, piante, lieviti, funghi ed alcuni batteri, e definita la loro funzione nel flusso extracellulare di lipidi, il loro ruolo biologico *in planta* non è ancora stato identificato in modo univoco.

Le nsLTPs sono proteine a basso peso molecolare, in particolare sono state descritte due tipologie di LTPs vegetali: LTP₁ con peso molecolare pari a circa 9 KDa e LTP₂ con peso molecolare pari a circa 7 KDa. Le LTP₁ sono proteine basiche, con punto isoelettrico (pI) compreso fra 8,5 e 10, costituite da circa 90-95 residui amminoacidici, otto dei quali sono residui conservati di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intramolecolari; inoltre tali proteine non contengono residui aromatici quali triptofano e fenilalanina (66). Tali proteine sono espresse come precursori, dotate di una sequenza segnale N-terminale denominata *signal peptide*, necessaria per indirizzare la pre-proteina nella via secretoria e successivamente la proteina matura nel corretto sito. nsLTPs di varie specie vegetali risultano localizzate a livello della parete cellulare per esempio in *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* (67), *Ricinus communis* (68) e semi di *Vigna unguiculata*.

Le nsLTPs fanno parte di una superfamiglia di proteine, definita delle prolammine e ad oggi ne sono state identificate più di 100 in specie vegetali; in particolare sono state descritte più di 63 LTPs allergeniche, 46 delle quali espresse in parti commestibili per l'uomo (69). Vari studi hanno dimostrato come le nsLTPs si concentrino maggiormente nella buccia dei frutti, di

recente l'allergene Pru p 3 (LTP di pesca) è stato principalmente identificato negli strati più esterni del frutto mediante tecniche di spettrometria di massa (ESI e MALDI) (70). Nonostante questo è possibile definire le nsLTPs come proteine ubiquitarie, tant'è che sono largamente diffuse in vari organi delle specie vegetali quali semi, foglie, frutti, fiori e più raramente nelle radici. La loro localizzazione in pianta suggerisce vari ruoli biologici: oltre ad un ruolo evidentemente primario nel trasporto ed accumulo di lipidi, è stata proposta una funzione nei meccanismi di difesa della pianta. Infatti sono state osservate proprietà antifungine ed antibatteriche delle nsLTPs, ed una loro maggior espressione *in planta* a seguito di stress biotici ed abiotici.

Dal punto di vista genomico, le nsLTPs risultano codificate da un complesso multigenico disperso nel patrimonio cromosomico, questo è indicativo della presenza di isoforme di nsLTPs nelle specie vegetali. Sono stati per esempio identificati 10 geni in *Arabidopsis thaliana*, 10 geni in *Oryza sativa* e 15 geni in *Triticum aestivum* esaploide (71). Per i vari geni sono stati individuati pattern di espressione differenti e complessi, ognuno dei quali è modulato dalle condizioni ambientali esterne ed è caratterizzato da una diversa distribuzione nei tessuti.

5.2. Studi strutturali

Numerosi studi strutturali mediante cristallografia a raggi X e NMR sono stati condotti su *plant nsLTPs*, le proteine allergeniche analizzate mostrano un unico dominio compatto caratterizzato da quattro α -eliche ed una coda C-terminale; tale struttura tridimensionale è tipica delle nsLTPs ed è stata definita *plant nsLTPs fold* (Figura 7).

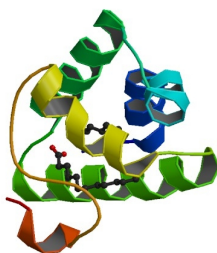


Figura 7. Pru p 3 (LTP di Pesca), prototipo delle *plant nsLTPs* (Pasquato et al. 2005)

La quattro α -eliche (H1-H4) sono collegate da un network di quattro ponti disolfuro, e legami idrogeno intramolecolari contribuiscono a stabilizzare la struttura. Il *fold* delle nsLTPs è

caratterizzato da una cavità a tunnel lungo l'asse della molecola in grado di accomodare molecole di natura anfipatica; ad oggi sono numerosi i complessi fra LTP e molecole lipidiche cristallizzati, per esempio relativamente ad LTP di grano, orzo, mais, riso, tabacco e pesca. I modelli strutturali delle nsLTPs hanno inoltre consentito l'approfondimento degli studi riguardo il loro ipotetico ruolo biologico di *carrier* di molecole idrofobiche quali fosfolipidi, acidi grassi, AcilCoA ed altre molecole contenenti gruppi acile.

La cavità è stata definita *saxophone-like fold* per il ripiegamento caratteristico ed espone sulla superficie interna residui idrofobici e presenta due aperture, una in prossimità dell'estremità C-terminale dell'elica H₂, ed una posizionata all'estremità C-terminale dell'elica H₃ (72).

In una comparazione fra la struttura di Pru p 3 ed nsLTPs di cereali è emerso che le LTP di riso, orzo e grano risultano molto simili fra loro, diversamente LTP di pesca e mais appaiono differenti; le differenze riscontrate sono relative alla plasticità della cavità interna e quindi alla capacità di accomodare ligandi in maniera aspecifica (73). Per esempio è stato osservato che la nsLTP₁₋₁ di tabacco è in grado di legare solo un acido grasso o fosfolipide, mentre nsLTPs di mais o frumento possono interagire con una o due molecole lipidiche in una orientazione testa-coda (74). Per esempio in figura 8 è riportata la struttura tridimensionale di LTP di Orzo che presenta nella *lipid-binding cavity* una molecola di palmitato.

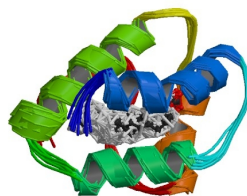


Figura 8. Struttura 3D di LTP di orzo complessata con una molecola di Acido Palmitico. (Lerche et al. 1998)

In generale la capacità delle nsLTPs di legare una grande varietà di molecole idrofobiche anche dotate di gruppi polari, è dovuta alla flessibilità della cavità; questo risulta coerente con l'ipotesi un ipotetico ruolo nella biosintesi degli strati protettivi superficiali della pianta quali la cutina (75).

5.3. Ruolo biologico

Ad oggi non è ancora stato identificato un ruolo biologico univoco per le nsLTPs. Data la capacità delle nsLTPs di legare in maniera aspecifica un'ampia varietà di molecole idrofobiche è stato proposto un ruolo nel traffico intracellulare di lipidi; tuttavia la localizzazione extracellulare di tali proteine suggerisce piuttosto un coinvolgimento nella formazione degli strati protettivi esterni della pianta, in particolare nel trasporto di monomeri di cutina e suberina (76). Inoltre queste ipotesi risultano coerenti con una più abbondante localizzazione delle nsLTPs negli strati esterni dei frutti, determinando quindi una potenziale maggior allergenicità dei frutti consumati con buccia.

Vari studi hanno evidenziato un'attività inibitoria delle nsLTPs verso fitopatogeni di natura fungina e batterica, suggerendo un possibile ruolo nei meccanismi di difesa della pianta (77). E' stato infatti riportato che stress biotici ed anche stress ambientali abiotici quali siccità, freddo ed alte concentrazioni saline possono indurre l'espressione dei geni *ltp*; uno studio condotto su piante di pomodoro ha evidenziato un incremento dell'espressione di una proteina riconducibile ad una nsLTP a seguito di trattamento delle piante con alte concentrazioni saline (78). Vari studi hanno inoltre evidenziato un accumulo di nsLTPs nei tessuti delle foglie, dello stelo e dei frutti di piante di peperoncino a seguito dell'infezione da parte di *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Phytophthora capsici* e *Colletotricum gloeosporioides*, in particolare negli organi della pianta fortemente infettati (79).

In letteratura è inoltre riportato come LTP di fagiolo mungo mostri attività inibitorie nei confronti di alcune specie fungine quali *F.solani*, *F.oxysporum*, *P.aphanidermatum* e del batterio *S.aureus* (80).

Vari studi hanno inoltre evidenziato un aumento del grado di espressione di nsLTPs in piante di peperoncino inoculate con il virus del mosaico del tabacco (TMV) (81).

In generale le *plant nsLTPs* risultano attive nei confronti di numerose specie batteriche e fungine; chiaramente tale attività varia in relazione al ceppo e specie di patogeni, indicando quindi un certo grado di specificità delle nsLTPs. Il meccanismo genetico di risposta all'infezione da patogeni è estremamente complesso ed assimilabile a quello delle *Pathogenesis-related proteins*, proteine espresse nella pianta a seguito di attacchi da parte di patogeni.

E' stato osservato che l'espressione delle nsLTPs *in planta* oltre ad essere modulata da

condizioni ambientali esterne, è legata allo stadio di sviluppo della pianta; alcuni studi hanno riportato *patterns* di espressione dei geni codificanti per nsLTPs diversi durante la maturazione dei frutti in *Prunus persica*, determinando così una variazione del contenuto di proteine allergeniche nei frutti durante i vari stadi di maturazione (82).

Uno studio condotto su alcune *cultivar* di pomodoro ha proposto un ruolo per nsLTP nel processo di maturazione, in particolare nella fase di depolimerizzazione della pectina nella lamella mediana e parete cellulare dei tessuti vegetali. L'enzima principale implicato nel metabolismo della pectina è la Poligalatturonasi (PG), la quale sembra formare un complesso multienzimatico (PG₁ e PG_x) con attività pectinolitica *in planta*. All'interno del complesso multienzimatico è stata individuata come molecola attivatrice del complesso (ACT) una proteina appartenente alla famiglia delle nsLTPs. LTP sembra così essere in grado di convertire il complesso enzimatico in una forma più attiva e termostabile, aumentando quindi la degradazione di pectina *in vitro* e determinando la perdita di consistenza dei tessuti vegetali *in vivo* (83).

5.4.nsLTPs come allergeni alimentari

Le nsLTPs sono considerate le principali proteine allergeniche responsabili di fenomeni allergici a seguito dell'ingestione di alimenti di origine vegetale, con possibilità di reazioni sistemiche gravi (orticaria, angioedema, asma, anafilassi, ecc.) in Italia e nei paesi dell'Area Mediterranea (84). L'allergia alimentare primaria alle nsLTPs si verifica frequentemente anche in alimenti processati (85). In recenti studi è stata per esempio dimostrata la presenza di Lyc e 3 (LTP di pomodoro) immunoreattiva in derivati del pomodoro sottoposti a lavorazione industriale; è stato osservato che la regione di Lyc e 3 in grado di interagire con gli anticorpi IgE specifici, resisteva alla degradazione termica (86), alla digestione con pepsina (87) ed a proteolisi gastroduodenale (88). Si è ipotizzato che la resistenza alla degradazione possa aumentare l'abilità delle nsLTPs nel sensibilizzare i soggetti esposti e la gravità della sintomatologia allergica (89). Inoltre le nsLTPs sono note soprattutto nell'Area Mediterranea in quanto responsabili di reazioni crociate; in particolare le nsLTPs identificate nei frutti delle *Rosaceae* (mela, pera, ciliegia, ecc.) sono state ampiamente studiate per la frequente cross-reattività clinica osservata nei pazienti, evidentemente dovuta all'alta omologia di sequenza tra nsLTPs di *Rosaceae* e allergeni provenienti anche da altri alimenti. Le nsLTPs sono infatti

state identificate in numerose piante quali Pomoideae (mela, nespola, ecc.) e Prunoideae (pesca, susina, albicocca, ecc.) e specie botaniche meno note quali per esempio in *Vitis vinifera*, *Asparagus officinalis*, *B.oleracea* var. *capitata*.

Fra gli anni 1994 e 1999, sono stati condotti vari studi sulla caratterizzazione della struttura tridimensionale dell'LTP di cereali senza però evidenziarne il potenziale allergenico; nel 2006 Pasquato et al. (90) ha descritto la struttura tridimensionale di Pru p 3 (LTP di pesca), il modello di LTP allergenica, frequentemente associata a casi clinici di allergia alimentare. Successivamente sono stati identificati gli epitopi IgE-reattivi delle principali LTP di mela, pesca, albicocca e susina (91) e di Tri a 14, proteina allergenica del grano; in particolare quest'ultima mostrava una somiglianza di sequenza degli epitopi con quelli di pesca, anche nella struttura tridimensionale, giustificando quindi i fenomeni di cross-reattività.

Di recente all'interno della famiglia delle *Rosaceae* sono state caratterizzate due isoforme di LTP di pera (LTPa e LTPb), con caratteristiche molto simili alle altre nsLTPs di *Rosaceae*, esibendo stabilità termica, seppur inferiore a quella della LTP di pesca e cross-reattività nei confronti di quest'ultima (92).

Ad oggi un aspetto molto importante per gli studiosi è la diffusione di allergie a nsLTPs nell'area Mediterranea; vari studi epidemiologici hanno evidenziato la presenza di una correlazione fra manifestazioni allergiche verso nsLTPs e latitudine (93), in particolare è stato ipotizzato che la diversa esposizione ai pollini e le differenti abitudini alimentari possano determinare l'insorgenza di fenomeni allergici differenziati. Per esempio reazioni sistemiche quali l'anafilassi sono state in molti casi associate a nsLTPs di differenti fonti vegetali, quali alcuni frutti di bosco, mela (94), pomodoro (95), semi di girasole (96), grano (97) e nocciola (98).

Le nsLTPs sono quindi responsabili della sensibilizzazione primaria di individui, in particolare grazie alla loro resistenza alla digestione proteolitica ed al trattamento termico; sono infatti definite *true food allergens*, per la capacità di conservare l'immunoreattività a seguito del passaggio nel tratto gastrointestinale.

In alcune nsLTPs allergeniche quali Pru p 3, Pru av 3 e Vit v 1 è stata dimostrata la resistenza alla digestione proteolitica attraverso esperimenti di *simulated gastric fluid* (pepsina e pH acidi). Le proteine rimangono intatte nelle 2 ore successive al trattamento, ed anche nelle 24 ore successive, il 40% della proteina allergenica (nel caso di Pru p 3) risulta intatto (99).

Numerose nsLTPs mostrano resistenza anche ai trattamenti termici (Temperature > 100°C);

per esempio Pru p 3 (LTP di pesca) e Zea m 14 (LTP di mais) conservano la loro immunoreattività anche a seguito di trattamenti a 121°C per 30 minuti ed a 100°C per 2 ore, rispettivamente (100). La stabilità caratteristica delle nsLTPs a trattamenti termici e proteolitici spiegherebbe la presenza delle loro forme allergeniche attive anche in prodotti lavorati industrialmente quali birra, vino, succhi di frutta, marmellate e conserve.

Tuttavia negli ultimi anni è stato dimostrato come le nsLTPs allergeniche non si comportino in maniera omogenea sia dal punto di vista immunologico che clinico; per esempio è il caso di Mal d 3 (LTP di mela) che a seguito di trattamento a 100°C per 2 ore, subisce cambiamenti strutturali e mostra una significativamente ridotta *IgE-binding capacity*.

Un'altra peculiarità delle nsLTPs è che sono stati definite panallergeni in quanto responsabili di reazioni crociate; sono infatti spesso citati casi di cross-reattività tra nsLTPs allergeniche di *Rosaceae*, e tra queste ed allergeni appartenenti a specie botaniche molto lontane fra loro, questi fenomeni sono evidentemente giustificati dalla struttura tridimensionale conservata delle nsLTPs e quindi alla condivisione di epitopi per IgE.

5.5. "Mappaggio degli epitopi" delle nsLTPs

Ad oggi sono stati caratterizzati gli epitopi per IgE sono in alcune nsLTPs; la prima Lipid transfer protein ad essere caratterizzata strutturalmente e dal punto di vista dell' *IgE-binding capacity* è stata Pru p 3 (LTP di pesca). In particolare l'analisi di peptidi che riproducono l'intera sequenza di Pru p 3, utilizzando sieri di soggetti allergici alla pesca, ha permesso l'identificazione di epitopi lineari riconosciuti dalle IgE nelle regioni comprendenti i residui 11-25, 31-45 e 71-80 (101). Successivamente sono stati identificati gli epitopi per IgE in mela, pesca, albicocca e susina; come riportato da altri studiosi le nsLTPs analizzate mostravano una struttura tridimensionale conservata, la cui superficie era caratterizzata da regioni in grado di legare le IgE e quindi accessibili a quest'ultime. In uno studio condotto sul mappaggio degli epitopi in nsLTPs di *Rosaceae* con differenti sieri contenenti IgE specifiche di pazienti allergici ai frutti delle *Rosaceae* ha infatti rivelato la presenza di quattro regioni IgE-reattive lungo la catena aminoacidica e sulla superficie molecolare delle nsLTPs analizzate (102). La maggior parte degli epitopi individuati conteneva residui aminoacidici caricati positivamente (Arg, Lys), mentre in misura minore conteneva residui caricati negativamente (Asp, Glu); questi residui risultano tipicamente esposti sulla superficie della molecola delle

nsLTPs allergeniche. Alcuni degli epitopi identificati coincidevano esattamente con quelli precedentemente caratterizzati in Pru p 3 ed altre *plant nsLTPs*, suggerendo la presenza di regioni IgE-reattive conservate fra le nsLTPs allergeniche della famiglia delle *Rosaceae* e di altri frutti. E' inoltre stato evidenziato come gli epitopi per IgE specifiche nelle nsLTPs siano distribuiti su un'unica ampia area accessibile, diversamente gli epitopi di altri allergeni (legumine, viciline delle arachidi e noci) risultano maggiormente dispersi sulla superficie della molecola (103).

Lo studio della struttura tridimensionale, della sequenza aminoacidica e quindi degli epitopi delle nsLTPs è stato possibile grazie all'isolamento del cDNA ed alla produzione in forma ricombinante delle proteine allergeniche. La disponibilità quindi di nsLTPs ricombinanti ha permesso l'individuazione di epitopi lineari e conformazionali, attraverso per esempio tecniche di mutagenesi dei residui aminoacidi coinvolti (104) e *spot technique* con peptidi di sintesi (102).

6.GLI ALLERGENI DEL POMODORO

6.1.Il pomodoro

Il pomodoro (*Lycopersicum esculentum*) è uno degli alimenti maggiormente consumati al mondo. La pianta di pomodoro appartiene alla famiglia delle *Solaneaceae* ed è di facile coltivabilità ed estremamente adattabile alle differenti condizioni climatiche, questo aspetto la rende particolarmente diffusa in tutto il mondo. Ad oggi sono state descritte numerose varietà di pomodoro e le relative cultivar sono state classificate in categorie basate principalmente sulla forma e dimensione del frutto (105).



Figura 9. Pomodori della Varietà San Marzano.

In Italia la sua produzione risulta principalmente localizzata in Emilia-Romagna (Province Parma e Piacenza), ed in Campania (province di Napoli e Salerno) (Figura 9) ed ha ormai raggiunto livelli elevati, soprattutto per le varietà destinate all'industria conserviera. Nel nostro clima il pomodoro è una pianta annuale, a fusto semilegnoso, incapace di reggersi quando le bacche s'ingrossano; presenta una radice fittonante e robusta, foglie composte e grandi che si diversificano fra una varietà e l'altra (106). Il frutto è una bacca di forma e colore talvolta diversi a seconda della varietà (da mensa, da concentrato, da pelati, da succo e da serbo). Per ciò che concerne le bacche, la parte utile è la polpa; la composizione media percentuale del frutto è la seguente: polpa e succo 96-97%, semi 2-3%, buccia 1-2%. Ciascun frutto è suddiviso in logge, di numero variabile, in cui sono contenuti i semi piccoli, di forma schiacciata e discoidale.

Nel frutto giunto a maturazione, i componenti principali sono: acqua (circa 94%), carboidrati disponibili (derivano dalla degradazione dell'amido e il loro contenuto si riduce passando alla varietà da insalata), acidi organici vari, licopene e β -carotene (pigmenti dal colore rosso e arancione che si formano nel corso della degradazione della clorofilla), vitamina C, potassio (fra i sali minerali) e sostanze volatili responsabili dell'aroma. Un componente estremamente importante è il licopene, il carotenoide più rappresentato nel pomodoro, noto per la sua attività di *quenching* dei radicali liberi, svolge inoltre un'importante azione protettiva nei confronti delle malattie cardiovascolari, diabete e cancro. E' stato infatti dimostrato come l'elevato consumo di pomodoro possa ridurre significativamente la possibilità di sviluppare cancro alla prostata (107).

La maturazione dei frutti della pianta di pomodoro è caratterizzata da modificazioni morfologiche e biochimiche; in particolare il fenomeno di maturazione comporta una serie di processi biochimici che portano alla formazione di composti quali carotenoidi responsabili del colore del frutto maturo, molecole volatili responsabili dell'aroma e zuccheri (108). Una delle sostanze sviluppate più importanti è l'etilene, che interviene nella respirazione, nella degradazione della clorofilla e nella perdita di consistenza del prodotto.

I cambiamenti che caratterizzano la maturazione sono resi possibili dalla presenza di enzimi implicati in vari processi metabolici, per esempio il cambiamento di consistenza della bacca è associato ad una modificazione della parete cellulare da parte di enzimi quali poligalatturonasi (PG), pectina metilesterasi (PME), β -galattosidasi, α -L-arabinofuranosidasi, glucanasi, ecc. Uno dei più importanti è la poligalatturonasi, coinvolta nella degradazione

della pectina presente nella parete cellulare, e quindi conseguentemente nell'aumento di soffici ta della bacca durante la maturazione. Tale enzima esplica la sua funzione in un complesso multiproteico, da tale complesso   stata isolata e caratterizzata una proteina appartenente alla famiglia delle nsLTPs che oltre a svolgere un ruolo nella depolimerizzazione della pectina,   stata anche riconosciuta come allergene del pomodoro.

6.2. Gli allergeni del pomodoro

Ad oggi il pomodoro   uno dei maggior componenti della dieta della popolazione mondiale, in particolare il consumo globale di questo prodotto   aumentato considerevolmente nelle ultime due decadi. Tuttavia il pomodoro   noto per le sue potenzialit  allergeniche; l'allergia al pomodoro sembra verificarsi con una frequenza variabile fra 1.5% in Nord Europa e 16% in Italia nella popolazione gi  affetta da altre allergie alimentari. Le manifestazioni cliniche associate sono principalmente localizzate nella mucosa orale, ma il pomodoro   anche in grado di provocare reazioni sistemiche gravi (anafilassi). I principali sintomi sono quindi riconducibili alla Oral Allergy Syndrome (OAS) accompagnata da nausea e dolori addominali; la sindrome da contatto prevede invece orticaria che pu  essere accompagnata da dermatiti e angioderma.

Generalmente l'allergia ai pomodori deriva da un fenomeno di cross-reattivit  con i pollini, quindi la maggior parte dei pazienti allergici sviluppa i sintomi a seguito del consumo di pomodoro fresco, diversamente tollera i derivati industriali; ad oggi sono stati tuttavia registrati casi di reattivit  immunologica a prodotti lavorati (109).

Differenti studi hanno dimostrato come l'allergenicit  dei frutti possa essere influenzata da parametri biologici e fisico-chimici quali per esempio la variet  selezionata (110), il rapporto fra contenuto di proteine e proteine allergeniche, stadio di maturazione, ecc.

Le principali proteine identificate come allergeni del pomodoro sono Lyc e 1 (profilina), Lyc e 2 (β -fruttofuranosidasi) e Lyc e 3 (nsLTP). Lyc e 1 appartiene alla famiglia delle profiline, ha un peso molecolare di circa 14 KDa ed   in grado di legare la forma globulare dell'actina;   stato osservato che Lyc e 1 assieme a Lyc e 3   responsabile dell'allergenicit  dei frutti nelle fasi iniziali di maturazione. La sua IgE-binding capacity risulta moderata, tuttavia mostra una spiccata cross-reattivit  con profiline di altre specie vegetali (111).

Un'altro importante allergene immunoreattivo del pomodoro   la β -fruttofuranosidasi, una

proteina di circa 50 KDa anche conosciuta come invertasi in quanto catalizza la reazione di idrolisi del saccarosio nei monosaccaridi glucosio e fruttosio; in particolare la β -fruttofuranosidasi del pomodoro sembra giocare un ruolo importante nell'accumulo di esosi durante il processo di maturazione del frutto (112). L'allergenicità di questa proteina è stata da tempo confermata ed è stata osservata una sua maggior espressione durante gli stadi tardivi di sviluppo della pianta, determinando un conseguente aumento della risposta allergica nei soggetti sensibilizzati.

Lyc e 3 appartiene alla famiglia delle nsLTPs in particolare è una LTP₁ con un peso molecolare di circa 8-10 KDa, è inoltre membro del gruppo 14 delle *Pathogenesis-related proteins* (PRs). La sensibilizzazione a nsLTPs è stata principalmente osservata nell'area Mediterranea, dove è anche maggiore la coltivazione ed il consumo di pomodoro, come di altri alimenti vegetali quali frutti della famiglia delle *Rosaceae*.

In letteratura sono state descritte altre potenziali proteine allergeniche del pomodoro quali poligalatturonasi 2A (PG2A), 11S globulina, chitinasi, glucanasi, perossidasi, pectin metilesterasi e vicilina (113). E' anche stato evidenziato come gli allergeni del pomodoro siano coinvolti in fenomeni di cross-reattività con allergeni di altri frutti quali pesca, melone, arachidi e pollini di *Platanus acerifolia* e *Artemisia vulgaris* (114).

In uno studio recentemente pubblicato è stata identificata una nuova proteina allergenica del pomodoro, omologa alla proteina ribosomiale 60S della mandorla (Pru du 5), di 45 KDa e con una significativa *IgE-binding capacity* nei confronti di sieri di individui sensibilizzati al pomodoro (115).

6.3.LTP di pomodoro

Lyc e 3 è la *Lipid Transfer protein* di pomodoro, di peso molecolare di circa 8-10 KDa; dal punto di vista strutturale è analoga alle altre nsLTPs vegetali, con una struttura tridimensionale caratterizzata da quattro α -eliche unite da un network di quattro ponti disolfuro. E' proprio l'omologia di struttura presente fra le *plant nsLTPs* a determinare fenomeni di cross-reattività fra Lyc e 3 e LTP di frutti appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae*.

Fra i ruoli biologici proposti per LTP di pomodoro quello più importante è di attivatore del complesso multienzimatico della Poligalatturonasi (PG), con effetti nel processo di

degradazione della pectina in fase di maturazione del frutto (83); inoltre è stato ipotizzato un coinvolgimento nella regolazione dei processi PG-mediati quali l'abscissione del frutto e la xilogenesi e nei meccanismi di riparazione delle cellule a seguito di periodi di siccità o in condizioni di stress salino (78).

E' stato inoltre dimostrato che Lyc e 3 risulta maggiormente presente nella buccia di pomodoro rispetto alla polpa; LTP di pomodoro è stata anche individuata nei semi di alcune varietà di pomodoro (109), suggerendo una probabile funzione nel trasporto dei lipidi dall'endosperma all'embrione e di difesa dei semi dalle infezioni durante la fase di germinazione.

Non tutti gli individui allergici al pomodoro riconoscono Lyc e 3 come allergene, trattandosi quindi di un allergene minore; tuttavia è stata dimostrata la presenza di questa proteina allergenica anche in prodotti commerciali quali pelati, puree di pomodoro, concentrato di pomodoro, rendendo quindi questi prodotti non sicuri per gli individui sensibilizzati alle nsLTPs. I processi industriali di lavorazione del pomodoro sono vari e spesso molto intensi, nonostante questo Lyc e 3 sembra essere l'unica proteina allergenica attiva presente nei prodotti finiti.

In letteratura sono riportati studi di riduzione del potenziale allergenico del pomodoro, mediante silenziamento del gene codificante per Lyc e 3; test *in vitro* e SPT con estratti di pomodori transgenici su pazienti allergici hanno effettivamente evidenziato una ridotta allergenicità (116). Inoltre l'inibizione dell'espressione di Lyc e 3 non ha mostrato alterazioni del fenotipo della pianta di pomodoro; le piante *wild-type* e transgeniche risultavano identiche, sia nel periodo di fioritura che nella morfologia dei frutti. Come per altre *plant nsLTPs* è stata ipotizzata la presenza di una famiglia multigenica dispersa nel patrimonio cromosomico, codificante per differenti isoforme di LTP di pomodoro, che nella fattispecie sembravano equivalenti dal punto di vista funzionale, ed in grado di ripristinare le funzioni attribuite al gene silenziato (117).

SCOPO DELLA RICERCA

Ad oggi fra gli allergeni più studiati ritroviamo le *non specific lipid transfer protein* (nsLTP), una famiglia di allergeni estremamente diffusa nel regno vegetale ed in grado di scatenare reazioni sistemiche nei soggetti allergici. Nell'area Mediterranea le nsLTP sono i maggiori allergeni dei frutti appartenenti alla famiglia botanica delle *Rosaceae*, ed in particolare è stata dimostrata la cross-reattività fra nsLTP di *Rosaceae* e specie botaniche non correlate. La presenza di nsLTP in grado di scatenare reazioni allergiche non è solo limitata alla frutta, sono infatti numerosi i casi di cross-reattività con nsLTPs presenti in differenti alimenti di origine vegetale. Fra le proteine allergeniche del pomodoro è stata identificata *Lyc e 3* (LTP di pomodoro), ed un recente lavoro ha appunto dimostrato che questa famiglia di proteine rappresenta l'unico allergene presente dopo lavorazione industriale del pomodoro a causa dell'elevata stabilità e resistenza termica (Pravettoni et al., 2009). Studi riportati in letteratura hanno inoltre dimostrato l'esistenza di varie isoforme di LTP di pomodoro codificate da molteplici sequenze nucleotidiche ed evidentemente con differenti funzioni biologiche. Allo stato attuale non si conosce il vero ruolo biologico delle nsLTP allergeniche ed in particolare, nel caso delle nsLTP di pomodoro, la localizzazione *in planta* e la sua reattività come allergene alimentare.

Il presente lavoro di ricerca si è quindi focalizzato sull'identificazione, caratterizzazione biochimica ed immunologica delle isoforme di LTP presenti in diverse varietà botaniche di pomodoro. In particolare si è voluto valutare la distribuzione delle nsLTP di pomodoro in tessuti di differenti cultivar e successivamente si è voluto identificare le singole isoforme, verificandone l'abbondanza relativa nella buccia dei pomodori delle cultivar analizzate. Sono state quindi selezionate varietà di pomodoro comuni disponibili in commercio e che presentassero allo stesso tempo caratteristiche peculiari quali per esempio la provenienza geografica e lo stadio di maturazione. Una volta verificata la distribuzione delle nsLTP di pomodoro, è risultato interessante differenziare il grado di espressione delle singole isoforme nei tessuti di pomodoro; a tale scopo è in fase di completamento la progettazione di sonde specifiche per l'analisi Northern blotting.

Successivamente si è voluto produrre in forma ricombinante le isoforme identificate più rappresentative ai fini della caratterizzazione biochimica e immunologica. Ad oggi l'isoforma X56040 è stata prodotta in forma ricombinante ed è stata studiata la struttura, la stabilità

termica e la capacità di legame; inoltre in collaborazione con l'Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS di Roma, la proteina allergenica è stata caratterizzata dal punto di vista immunologico.

RISULTATI E DISCUSSIONE I PARTE

1. ESTRAZIONE DI RNA DI BUCCIA, POLPA E SEMI DI POMODORO

Sono state acquistate quattro varietà diverse di pomodoro San Marzano, Lancelot Insalatato, Marinda e Piccadilly, verificando l'origine geografica di ognuna. Il pomodoro San Marzano dell'agro sarnese-nocerino DOP ha una forma allungata, di colore rosso molto acceso e particolarmente adatto per la preparazione di pelati e conserve. La varietà Piccadilly proveniente dalla Sicilia è un ibrido appartenente alla tipologia dei pomodori vesuviani quindi di facile conservazione, lunga durata nonostante la consistenza succosa e morbida. È stata inoltre selezionata la varietà Marinda (Sicilia), ibrido della tipologia Marmande dalla polpa croccante e succosità non eccessiva, e dalla buona conservabilità. Infine è stata scelta la varietà Lancelot della tipologia Insalatato, ibrido San Marzano, i cui frutti sono unicolore di forma cilindrica allungata ed i frutti maturi sono dotati di una notevole durezza, un'ottima conservazione post-raccolta e una elevata resistenza ai trasporti. Da ciascuna tipologia di pomodoro sono stati prelevati buccia e polpa e nel caso del San Marzano anche i semi; tutti questi tessuti sono stati impiegati per l'estrazione dell'RNA. Il protocollo impiegato ha consentito una buona estrazione di RNA totale e l'integrità di quest'ultimo è stata verificata attraverso elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti; la qualità dell'RNA ribosomiale, l'unico visibile su gel, è considerata indicativa della qualità complessiva dell'RNA totale estratto. In Figura 10 è riportato l'RNA totale estratto da buccia e polpa di pomodoro Piccadilly, è possibile notare le bande relative alle subunità dell'RNA ribosomiale che evidenziano una buona qualità dell'RNA estratto.

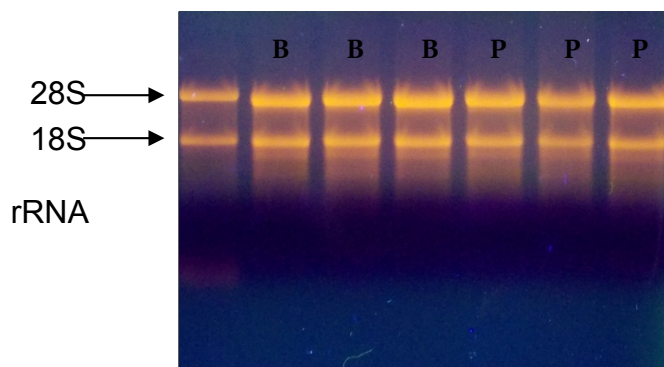


Figura 10. Corsa elettroforetica su gel di agarosio di RNA totale estratto da buccia e polpa di pomodoro, varietà Piccadilly. M: 1 μ g di marker, RNA totale di lievito. B: 1 μ g di RNA totale estratto da buccia. P: 1 μ g di RNA totale estratto da polpa.

L'RNA totale estratto da buccia e polpa di pomodoro è stato quantificato attraverso misure spettrofotometriche e ne è stata valutata la purezza calcolando il rapporto OD_{260nm} / OD_{280nm} . In tutte le varietà di pomodoro analizzate sono state ottenute buone quantità di RNA; in particolare l'RNA estratto da varietà i cui frutti vengono generalmente commercializzati ad uno stadio di maturazione non avanzato (per esempio Lancelot Insalaturo), si è mostrato con un ottimo grado di purezza e privo di degradati.

2. RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR)

2.1 Progettazione dei primers per l'isolamento di cDNA codificante per nsLTPs in pomodoro e RT-PCR

1 µg dell'RNA ottenuto precedentemente è stato utilizzato in una reazione di retrotrascrizione mediante Trascrittasi Inversa (M-MLV) al fine di ottenere un ibrido cDNA/RNA che è stato successivamente utilizzato come template nell'amplificazione mediante PCR. L'RT-PCR è stata utilizzata per la sintesi delle sonde marcate necessarie per l'analisi Northern blotting. Per l'allestimento della PCR è stato necessario progettare primers in grado di appaiarsi a tutte le sequenze codificanti per nsLTP di pomodoro; a tale scopo sono state individuate le sequenze codificanti per LTP di pomodoro depositate in banca dati, eliminando le sequenze ridondanti, ed allineate mediante il software *Clustal X*. In figura 11 è riportato l'allineamento multiplo delle principali sequenze individuate e registrate con i seguenti *Accession number*: AM051295, AM051296, X56040 e AK224707. È stato così possibile individuare le regioni conservate utili ai fini della progettazione dei primers specifici per le nsLTP di pomodoro (*LTP plus* ed *LTP minus*).

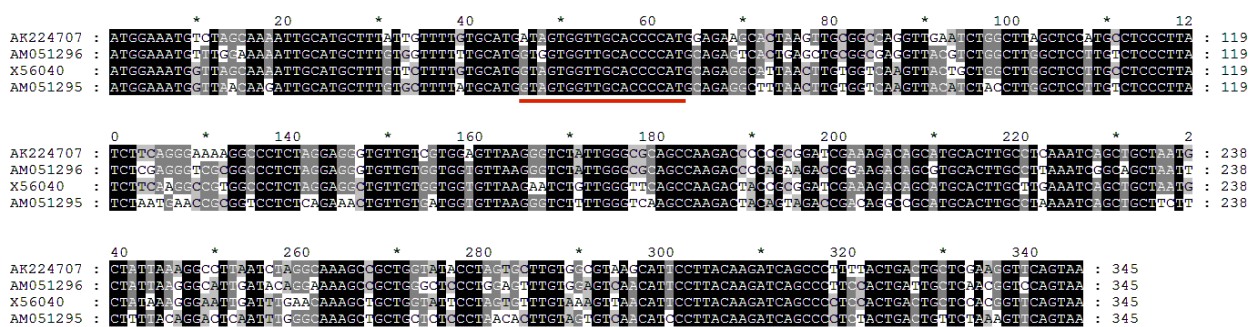


Figura 11. Allineamento multiplo delle sequenze nucleotidiche codificanti per nsLTP di pomodoro presenti in banca dati e primers *LTP plus* e *LTP minus* indicati dalla linea rossa.

Come è possibile notare in Figura 12, l'amplificazione mediante PCR è andata a buon fine consentendo di ottenere due ampliconi corrispondenti rispettivamente a cDNA di buccia e polpa di pomodoro codificante per le nsLTP. È stato utilizzato come ulteriore controllo un campione contenente come template l'RNA totale estratto, in modo da verificare l'assenza di contaminazioni significative di DNA in quest'ultimo.

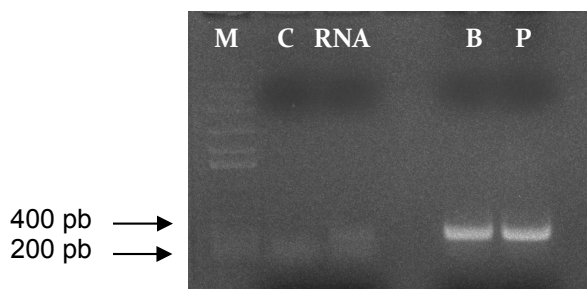


Figura 12. Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione. Pomodoro varietà Piccadilly. M: marker. P: amplificato da polpa. B: amplificato da buccia.

3. ANALISI NORTHERN BLOTTING DI RNA TOTALE DI BUCCIA E POLPA DI POMODORO

3.1. Preparazione delle sonde biotinilate per LTP presenti in Buccia e Polpa di pomodoro

Al fine di verificare la distribuzione tissutale delle nsLTP di pomodoro in polpa e buccia e, nel caso della varietà San Marzano, anche nei semi, l'RNA totale estratto è stato sottoposto ad analisi Northern Blotting. Per il riconoscimento della sequenza *target*, nella fattispecie le sequenze codificanti per nsLTP di pomodoro, sono state sintetizzate mediante PCR sonde di DNA marcate con Biotina. E' stato impiegato come template il cDNA di polpa e buccia ottenuto precedentemente, i *primers* LTP plus e LTP minus ed una miscela di nucleotidi contenente dUTP marcato con Biotina. L'avvenuta amplificazione è stata verificata mediante analisi elettroforetica. Come è possibile evidenziare in figura 13, relativa all'ottenimento della sonda marcata codificante per le isoforme di LTP presenti nella buccia di pomodoro (varietà Piccadilly), l'incorporazione del dUTP biotinilato ha determinato una migrazione differenziale rispetto allo stesso amplicone non marcato.

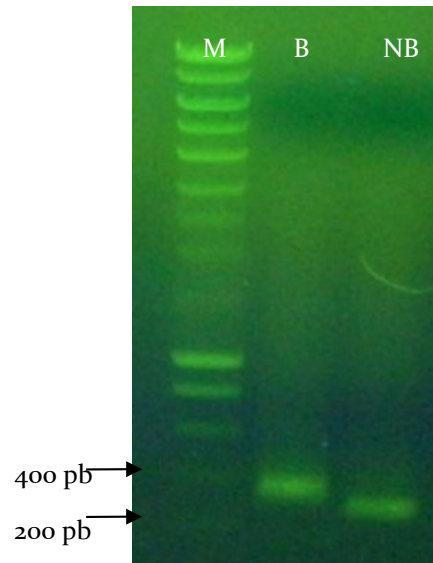


Figura 13. Analisi elettroforetica su gel di agarosio della sonda specifica per le isoforme di LTP presenti in buccia di pomodoro (varietà Piccadilly) M: marker. B: amplicone da buccia biotinilato. NB: amplicone da buccia non biotinilato.

Al termine della corsa elettroforetica gli ampliconi biotinilati ottenuti per polpa e buccia delle varietà di pomodoro, sono stati purificati da gel mediante l'utilizzo del kit QIAGEN e quantificati su gel di agarosio. Con riferimento alla varietà di pomodoro Piccadilly sono stati ottenuti circa 600 ng rispettivamente di sonda biotinilata per LTP presenti in buccia e per LTP presenti in polpa di pomodoro.

3.2. Analisi Northern Blotting

Per ciascuna varietà di pomodoro è stata eseguita l'analisi Northern blotting trasferendo su membrana in nylon rispettivamente 15 e 25 µg di RNA totale estratto da buccia e polpa di pomodoro. Dopo trasferimento, effettuato mediante *vacuum blotter*, la membrana è stata suddivisa al fine di ottenere due filtri identici da ibridare rispettivamente con le sonde biotinilate per nsLTP ottenute mediante RT-PCR da buccia e polpa di pomodoro. In figura 14 è riportata la corsa elettroforetica dei campioni di RNA estratto da buccia e polpa di pomodoro della varietà Piccadilly, ed il medesimo *pattern* elettroforetico visibile sul filtro a seguito del trasferimento.

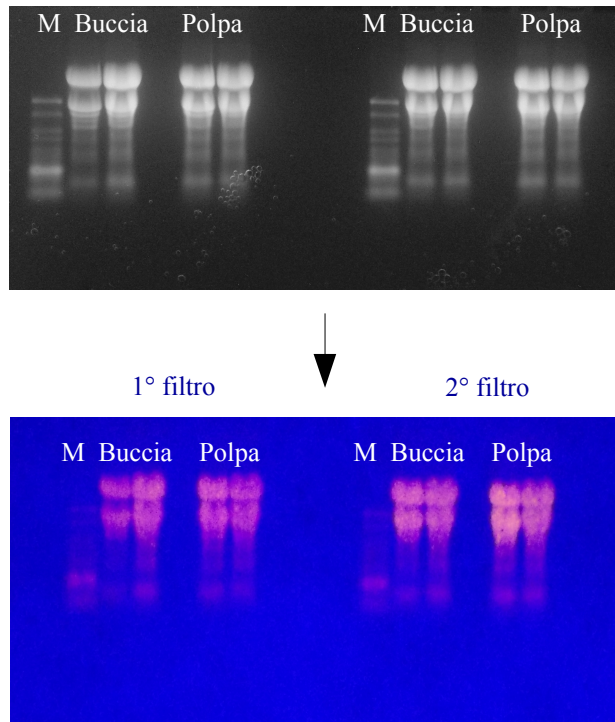


Figura 14. Corsa elettroforetica in condizioni denaturanti di RNA totale estratto da buccia e polpa di pomodoro (varietà Piccadilly) e membrana dopo trasferimento. M: marker commerciale (Invitrogen). Buccia: 15 μ g e 25 μ g di RNA totale di buccia. Polpa: 15 μ g e 25 μ g di RNA totale di polpa.

Successivamente alle fasi di ibridazione, effettuata con 600 ng di sonda biotinilata ed incubazione con streptavidina, i filtri sono stati sottoposti a scansione con scanner Odyssey (LI-COR Biosciences). In precedenza 100 pg di sonda biotinilata erano stati depositati su filtro e la presenza di un segnale visibile a seguito della scansione, ci ha permesso di verificare l'efficacia di interazione fra la Biotina e la streptavidina (Streptavidina-IR Dye 680). Quindi l'analisi dei segnali degli mRNA presenti sul filtro ha evidenziato in tutte le varietà di pomodoro considerate l'assenza di specifici trascritti in polpa mentre la presenza di una singola banda di lunghezza compresa fra 800 e 1000 pb in buccia. In particolare, nel caso del pomodoro varietà San Marzano è stato anche analizzato l'mRNA di semi, nel quale risultano non essere presenti segnali individuati dalle sonde per nsLTP di pomodoro. Per esempio in figura 15 sono riportati i segnali degli mRNA ibridati con la sonda biotinilata per nsLTP presenti in buccia. Dunque i dati ottenuti evidenziano che la proteina allergenica LTP risulta molto più espressa nella buccia di tutte le varietà di pomodoro analizzate ed assente nei semi della varietà di pomodoro San Marzano; anche l'analisi Northern blotting effettuata con la sonda per nsLTP ottenuta da polpa ha evidenziato la presenza di specifici trascritti di

dimensioni comprese fra 800 pb e 1000 pb. Principalmente in buccia di pomodoro, questo dato è in accordo con precedenti lavori effettuati su pesca (Botton et al., 2002; Botton et al., 2009; Brenna et al., 2004) e con studi clinici (Fernandez-Rivas and Cuevas, 1999; fernandez-Rivas et al., 1997) che hanno mostrato una minor allergenicità della polpa rispetto alla buccia in *Rosaceae*.

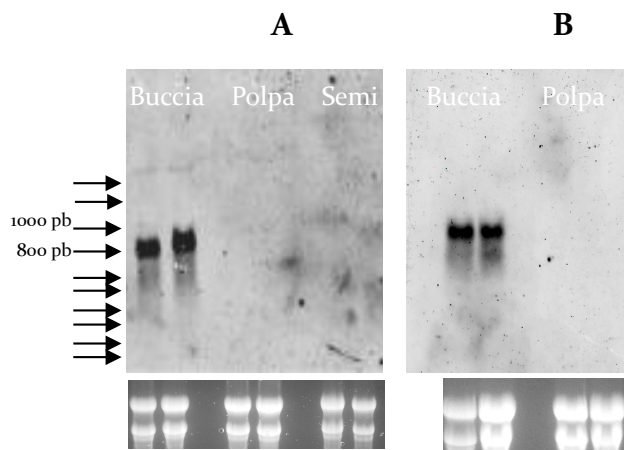


Figura 15. Analisi dei segnali degli mRNA presenti sul filtro ibridati con sonda biotinilata codificante per le isoforme di LTP presenti in buccia. A. Varietà san Marzano B. varietà Lancelot Insalatato.

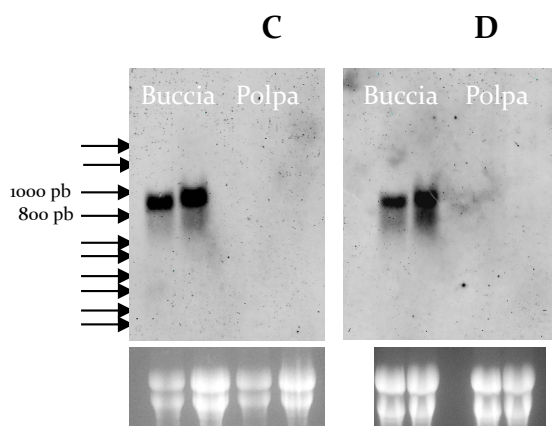


Figura 15. Analisi dei segnali degli mRNA presenti sul filtro ibridati con sonda biotinilata codificante per le isoforme di LTP presenti in buccia. C. varietà Piccadilly D. Varietà Marinda.

A seguito della fase di TOUCH DOWN PCR è stata verificata la presenza di un amplicone di dimensioni comprese fra 500 e 700 pb, riconducibile a nsLTP di pomodoro, mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio. Come è possibile osservare in figura 17, è presente una banda più intensa corrispondente al suddetto amplicone sia relativamente all'isoforma AM051296 che all'isoforma AM051295; le altre bande leggermente visibili corrispondono a frammenti aspecifici.

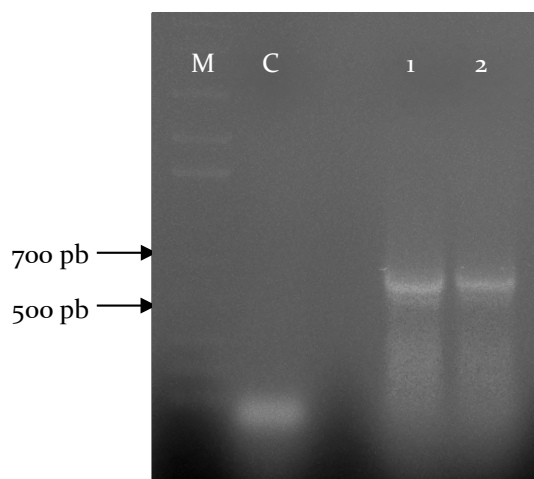


Figura 17. Analisi elettroforetica su gel di agarosio delle reazioni di Touch-down PCR. M. Marker. C: Controllo negativo. 1: Isoforma AM051295. 2: AM051296.

Una volta ottenuti entrambi i frammenti purificati, si è proceduto con il clonaggio nel vettore pGEM-T-Easy e sequenziamento dei plasmidi ricombinanti. L'analisi dei sequenziamenti ha permesso dapprima di verificare che i frammenti amplificati e successivamente clonati corrispondessero realmente alle isoforme AM051295 e AM051296 di pomodoro, e di confrontarne le regioni ottenute al 3' con quelle già note delle isoforme X56040 e AK224707. In figura 18 è riportato l'allineamento multiplo delle sequenze complete delle nsLTP di pomodoro; in particolare a valle della sequenza codificante (1...346) è possibile osservare l'assenza di regioni particolarmente conservate e quindi idonee alla progettazione delle sonde specifiche. Ad oggi sono state quindi ottenute le sequenze complete delle nsLTP di pomodoro, necessarie in futuro per l'analisi Northern Blotting per il riconoscimento delle singole isoforme di LTP nei tessuti di pomodoro.

```

AK224707 :      *      20      *      40      *      60      *
RaceAM0512 : ATGGCAAAAGCTCAGCAAAAATTTGGAACTCTTAAATGCTTTTATGATGATAGCTGGTGGCA : 58
X56040 :      *      *      *      *      *      *      *
AM051295 : ATGGCAAAAGCTTAAACAACATTTGCAAGCTTTTGTGCTTTTATGATGATAGCTGGTGGCA : 58

0      *      80      *      100      *      120      *
AK224707 : CCCATCGAGAACTCACTTAACTTGGGGGAGSTTGAATCTGGCTTACTGCTCCATGCTCCCT : 117
RaceAM0512 : CCCATCGAGAACTCACTTAACTTGGGGGAGSTTGAATCTGGCTTACTGCTCCATGCTCCCT : 117
X56040 : CCCATCGAGAACTCACTTAACTTGGGGGAGSTTGAATCTGGCTTACTGCTCCATGCTCCCT : 117
AM051295 : CCCATCGAGAACTCACTTAACTTGGGGGAGSTTGAATCTGGCTTACTGCTCCATGCTCCCT : 117

200      *      140      *      160      *
AK224707 : TATCTTCCAGGAAAAAGCCTCTAGGAGGCTGTGTCTTGGAGTTAAGGCTTATTGGG : 176
RaceAM0512 : TATCTTCCAGGAAAAAGCCTCTAGGAGGCTGTGTCTTGGAGTTAAGGCTTATTGGG : 154
X56040 : TATCTTCCAGGAAAAAGCCTCTAGGAGGCTGTGTCTTGGAGTTAAGGCTTATTGGG : 176
AM051295 : TATCTTCCAGGAAAAAGCCTCTAGGAGGCTGTGTCTTGGAGTTAAGGCTTATTGGG : 176

180      *      200      *      220      *
AK224707 : CGAGCCCAAGAGCCCTCCGATCCGAAACAGCACTTGCACCTTCAAAATCCAGCGCTA : 235
RaceAM0512 : CGAGCCCAAGAGCCCTCCGATCCGAAACAGCACTTGCACCTTCAAAATCCAGCGCTA : 213
X56040 : TTAGCCCAAGAGCTAAGCCGATCCGAAACAGCACTTGCACCTTCAAAATCCAGCGCTA : 235
AM051295 : TTAGCCCAAGAGCTAAGCCGATCCGAAACAGCACTTGCACCTTCAAAATCCAGCGCTA : 235

240      *      260      *      280      *
AK224707 : ATCTTATTAAGCCCTTAATCTAGCAAGGCGCTCTTAACTTCTTGTGCTGTA : 294
RaceAM0512 : ATCTTATTAAGCCCTTAATCTAGCAAGGCGCTCTTAACTTCTTGTGCTGTA : 272
X56040 : ATCTTATTAAGCCCTTAATCTAGCAAGGCGCTCTTAACTTCTTGTGCTGTA : 294
AM051295 : ATCTTATTAAGCCCTTAATCTAGCAAGGCGCTCTTAACTTCTTGTGCTGTA : 294

300      *      320      *      340      *
AK224707 : GCACTTCTTACAAGATCAGCCCTTACTGATGCTTAAAGTTTCACTAAAGCTGAT : 352
RaceAM0512 : AACATCTTCTTACAAGATCAGCCCTTACTGATGCTTAAAGTTTCACTAAAGCTGAT : 330
X56040 : AACATCTTCTTACAAGATCAGCCCTTACTGATGCTTAAAGTTTCACTAAAGCTGAT : 353
AM051295 : AACATCTTCTTACAAGATCAGCCCTTACTGATGCTTAAAGTTTCACTAAAGCTGAT : 353

360      *      380      *      400      *
AK224707 : ---GAAAGGCAATTTCCAGCCCATATTTGGGCAAAATTAAGACGATATATCTAT : 407
RaceAM0512 : ---GAAAGGCAATTTCCAGCCCATATTTGGGCAAAATTAAGACGATATATCTAT : 381
X56040 : ATCAAAATTTCCAGCCCATATTTGGGCAAAATTAAGACGATATATCTAT : 402
AM051295 : ATCAAAATTTCCAGCCCATATTTGGGCAAAATTAAGACGATATATCTAT : 402

420      *      440      *      460      *
AK224707 : GATTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 462
RaceAM0512 : GATTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 439
X56040 : GATTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 458
AM051295 : GATTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 458

480      *      500      *      520      *
AK224707 : TTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 518
RaceAM0512 : TTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 495
X56040 : TTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 516
AM051295 : TTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 515

540      *      560      *      580      *
AK224707 : GCTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 577
RaceAM0512 : GCTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 552
X56040 : TGTATTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 565
AM051295 : GATTTTCTTATCATCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT : 573

600      *      620      *      640      *
AK224707 : AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 597
RaceAM0512 : CAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 610
X56040 : AAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 583
AM051295 : TAGTCCAGTCTTGTATCCAAATTTCCAGATTTGGCTATGTTGCTATTAATTAATCTTT : 632

*      660      *      680      *      700      *
AK224707 : ----- : -
RaceAM0512 : GGGCCAGAAA----- : 621
X56040 : ----- : -
AM051295 : TAATACAGATCTATCTTATTTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAC : 691

*      720      *      740      *      760      *
AK224707 : ----- : -
RaceAM0512 : ----- : -
X56040 : ----- : -
AM051295 : CCAACTTTCTTGTACAAAGTTGTGGCGCCGCCAATCGAATTCGGCGGCCGCCATGGG : 750

*      780      *
AK224707 : ----- : -
RaceAM0512 : ----- : -
X56040 : ----- : -
AM051295 : GCCGNAGCATGNNNNNNNNNN : 773

```

Figura 18. Allineamento multiplo delle sequenze complete di nLTP di pomodoro già note in banca dati (AK224707 e X56040) e ottenute mediante 3'-Rapid amplification of cDNA ends (AM051295 e AM051296).

MATERIALI E METODI I PARTE

1. ESTRAZIONE DI RNA DI BUCCIA, POLPA E SEMI DI POMODORO

1.1. Preparazione dei tessuti vegetali di polpa, buccia e semi

Sono state selezionate quattro varietà di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*): Marinda, Lancelot insalataro, Piccadilly e San Marzano. Da ciascuna delle varietà sono stati prelevati i tessuti di polpa, buccia e semi, congelati immediatamente in azoto liquido e triturati finemente mediante mortaio e pestello. Le polveri ottenute sono state così raccolte in eppendorf sterili *RNAse free* preventivamente raffreddate in azoto liquido e il tutto è stato conservato a -80°C.

1.2. Estrazione RNA totale mediante impiego di Cloruro di Litio

Questa procedura è basata sulla lisi delle cellule vegetali utilizzando un buffer di lisi contenente Sodio dodecil solfato, sull'estrazione dei componenti proteici e glicoproteici mediante fenolo e sulla precipitazione selettiva degli acidi ribonucleici con Cloruro di Litio.

Il protocollo è stato messo in atto con successo anche per l'isolamento dell'RNA di polpa e buccia di pera Williams in un precedente lavoro sperimentale (Ramazzina et al. 2012).

Sono stati trasferiti circa 300 mg di polvere ottenuta da ciascun tessuto di pomodoro in una falcon contenente buffer di lisi (Cloruro di Sodio 0.6 M, EDTA 10 mM, Tris Hcl 100 mM pH 8, SDS 4%, portare a volume con H₂O DEPC) e fenolo 1:1. La miscela è stata omogeneizzata mediante Ultraturrex; l'omogenato ottenuto è stato sottoposto ad agitazione e centrifugazione per 20 minuti a 4°C al fine di ottenere la separazione delle fasi. Al surnatante prelevato è stato aggiunto un volume di fenolo, è stato agitato il tutto e centrifugato per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa superiore è stata sottoposta a precipitazione degli acidi nucleici con Acetato di Sodio (1/10 di volume di Acetato di Sodio 3M pH 5.2 DEPC e 2,5 volumi di Etanolo assoluto) a -80°C per 30 minuti. Al fine di ottenere la precipitazione selettiva dell'RNA, una volta recuperato il pellet contenente gli acidi nucleici, si è proceduto alla

precipitazione con Cloruro di Litio 10 M DEPC a 4°C o/n. La soluzione è stata quindi centrifugata e il pellet risospeso in 450 µL di acqua DEPC è stato sottoposto ad una fase di estrazione con una soluzione di fenolo-cloroformio (1:1) ed una fase di precipitazione con Acetato di Sodio (1/10 di volume di Acetato di Sodio 3M pH 5.2 DEPC e 2,5 volumi di Etanolo assoluto) a -80°C per 30 minuti.

L'RNA recuperato mediante centrifugazione è stato lavato con Etanolo 70% e risospeso in 20 µl di acqua DEPC.

1.3. Quantificazione mediante misura spettrofotometrica dell'RNA estratto

È stato acquisito lo spettro di assorbimento nel *range* di lunghezza d'onda 220-340 nm di ciascun campione di RNA estratto. Una volta ricavati i dati di OD a 260 nm e OD a 280 nm è stata calcolata la concentrazione dell'RNA mediante la formula $(OD_{260nm} * \text{fattore di diluizione}) / \text{Concentrazione}_{\text{RNA estratto}} * 40 \mu\text{g/ml}$ e verificata la purezza dell'RNA calcolando il rapporto $(OD_{260nm} / OD_{280nm})$.

1.4. Analisi elettroforetica dell'RNA totale in condizioni denaturanti

L'integrità di un RNA estratto può essere verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5% in condizioni denaturanti per impedire la formazione di strutture secondarie nell'RNA che potrebbero influire con la corsa elettroforetica. L'RNA è presente in piccole quantità all'interno di una cellula ed in particolare l'mRNA si trova in concentrazioni così ridotte da non poter essere visualizzato su gel; la frazione di RNA che viene visualizzata tramite gel è quella corrispondente alle frazioni 18S e 28S che costituiscono l'RNA ribosomiale (rRNA).

Ciascun campione preparato conteneva 2 µg di RNA, 5 µl di Sample Buffer colorato 2x (0.75 ml formamide, 0.150 ml MOPS 10X, 0.24 ml formaldeide 37%, 0.10 ml H₂O DEPC, 0.10 ml Glicerolo sterile, 0.08 ml Blu di bromofenolo 10%), 2 µl di etidio bromuro (500 µg/ml) e acqua DEPC fino ad un volume finale di 10 µl. Una volta assemblati i reagenti, i campioni sono stati denaturati a 65°C per 25 minuti in modo tale da non favorire la formazione delle strutture secondarie dell'RNA. I campioni raffreddati sono stati caricati su gel utilizzando come marker di riferimento delle frazioni 28S e 18S 2 µg di RNA totale di lievito. Il gel è stato preparato

mescolando agarosio (concentrazione finale 1.5%), H₂O DEPC, MOPS 10X (0,2 M MOPS pH 7, 20 mM Acetato di Sodio DEPC, 10 mM EDTA (pH 8) DEPC) e formaldeide solution al 37% (concentrazione finale circa 2%).

2.RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR)

2.1.Retrotrascrizione di mRNA totale

La trascrittasi inversa è una DNA polimerasi RNA-dipendente in grado di sintetizzare una catena di DNA complementare allo stampo di RNA. Richiede la presenza di dNTPs e *primers*, in particolare per gli mRNA eucariotici si usano primers di poly T complementari alla coda di poly A presente al 3' dell'mRNA. Al termine della reazione si ottiene un ibrido cDNA-mRNA. Sono stati preparati 15 µl di una soluzione contenente 1 µg di RNA totale, 2µl di primer oligo dT (500 µg/ml) e H₂O DEPC, successivamente incubata a 70°C per 5 min, in modo da consentire l'*annealing* del primer oligo dT alla coda di poly A. Una volta raffreddata sono stati aggiunti i seguenti reagenti: 5 µl buffer 5X M-MLVRT (Promega), 1 µl dNTPs 12,5 mM, 1 µl enzima Trascrittasi inversa M-MLVRT 200u/µl e H₂O DEPC fino ad un volume finale di 25 µl. La miscela è stata incubata per 1 ora a 42°C, cioè la temperatura di massima efficienza della trascrittasi inversa utilizzata.

2.2.Progettazione dei *primers* per l'isolamento di cDNA codificante per nsLTPs di pomodoro

L'RNA poliadenilato estratto da ogni tessuto di pomodoro è stato quindi utilizzato come templatato per generare una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA). Per isolare la porzione di cDNA codificante per nsLTPs di pomodoro sono stati progettati *primers* specifici. Tramite l'allineamento delle sequenze nucleotidiche codificanti per nsLTPs di pomodoro note in letteratura (depositate in banca dati www.ncbi.nlm.nih.gov), sono state individuate delle regioni sufficientemente conservate per poter realizzare dei *primers* che potessero appaiarsi con le sequenze analizzate. La lunghezza dei *primers* è data dalla temperatura di appaiamento che è calcolata attraverso la formula: $T^{\circ}\text{C di appaiamento} = 4(C+G)+2(A+T)-5^{\circ}\text{C}$.

LTP plus (T° appaiamento: 55°C) 5'- GTA GTG GTT GCA CCC CAT G-3'

LTP minus (T° appaiamento: 57°C) 5'- GGG CTG ATC TTG TAA GGA ATG -3'

2.3. Amplificazione del cDNA generato da retrotrascrizione di mRNA totale

Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando l'enzima GoTaq DNA polimerasi, la seguente miscela di reazione:

1 µl Primer LTP plus 25 µM

1 µl Primer LTP minus 25 µM

1 µl dNTPs 12,5 mM

10 µl Buffer GoTaq 5X

1 µl prodotto di retro trascrizione (templato)

0,2 µl GoTaq DNA polimerasi (5u/µl)

H₂O UV fino ad un volume finale di 50µl

Controllo negativo: miscela di reazione senza il templato.

Al fine di verificare la presenza di DNA nel campione di RNA è stato preparato un ulteriore controllo negativo utilizzando come templato il campione di RNA utilizzato nella reazione di retrotrascrizione (20 ng).

Di seguito sono riportati i cicli termici impostati nel termociclatore:

94°C x 5'

94°C x 45"

55°C x 45"

72°C x 45"

72°C x 7"

} 30 cicli

2.4. Purificazione dell'amplificato

Durante la reazione di PCR si può formare una piccola quantità di prodotti non specifici che

contaminano l'amplicone desiderato. La separazione elettroforetica su gel di agarosio può essere impiegata, oltre che per visualizzare il prodotto della PCR, anche per la sua purificazione. Si eliminano così i prodotti non specifici, quali i *primers* inutilizzati, nucleotidi non incorporati, enzimi e sali. La banda di amplificazione visualizzata su gel di agarosio 0.8% è stata così tagliata e sottoposta a protocollo di estrazione DNA da gel con kit QIAquick gel extraction (Qiagen). Il sistema QIAkit combina il vantaggio dell'uso di una *spin column* con l'aggiunta di una membrana in silice proprietà leganti selettive. I buffer in dotazione permettono poi un efficiente recupero del DNA e la rimozione di contaminanti. Il DNA in presenza di alto sale è adsorbito sulla membrana, mentre i contaminati vengono eluiti. Alla fine il DNA viene anch'esso eluito con acqua.

3. ANALISI NORTHERN BLOTTING

Il Northern blotting è una tecnica per la rivelazione di sequenze specifiche di RNA.

Il protocollo adottato include la separazione elettroforetica dell' RNA totale estratto, seguita dalla sua immobilizzazione su di una membrana, dall'ibridazione con una sonda marcata specifica per il riconoscimento di una sequenza *target* visualizzazione dei segnali degli mRNA ibridati con la sonda. Questa metodica consente quindi di identificare la presenza di un determinato mRNA e di stimarne la dimensione.

15 e 25 µg di RNA provenienti dalla buccia e dalla polpa delle varietà di pomodoro analizzate sono stati quindi denaturati per 25 minuti a 65°C e separati su gel di agarosio in condizioni denaturanti. Dopo l'elettroforesi il gel è stato sottoposto a vari lavaggi con acqua, successivamente con NaOH 50 mM e infine con SSC 10x (Citrato di Sodio 150 mM, NaCl 1.5 M pH 7).

Il gel è stato così sottoposto a trasferimento mediante *vacuum blot* su una membrana in nylon carica positivamente (Biodyne B Nylon Membranes, Pall Gelman Laboratory, MI USA). Successivamente l'RNA è stato fissato sulla membrana mediante *UV-crosslinking* che porta alla formazione di legami incrociati fra l'RNA e la membrana di nylon. È stata quindi predisposta l'ibridazione dell'RNA fissato alla membrana con circa 600 ng di sonda a DNA biotinilata. La preparazione di quest'ultima avviene mediante reazione PCR impiegando come template il cDNA di buccia e polpa codificante per le nsLTPs di pomodoro ed una miscela di nucleotidi contenente dUTP marcato con Biotina (Biotin-16-UTP). Di seguito sono

riportate la composizione della miscela della reazione calda (con Biotin-16-UTP), della reazione fredda (controllo senza Biotin-16-UTP) e del controllo negativo (senza template e Biotin-16-UTP):

	RX CALDA	RX FREDDA	CONTROLLO
DNA buccia e polpa	10 ng	10 ng	...
Primer plus 4µM	6.25 µl	6.25 µl	6.25 µl
Primer minus 4µM	6.25 µl	6.25 µl	6.25 µl
Buffer GoTaq 5X	5 µl	5 µl	5 µl
DATP 10 mM	0.625 µl	0.625 µl	0.625 µl
DCTP 10 mM	0.625 µl	0.625 µl	0.625 µl
DGTP 10 mM	0.625 µl	0.625 µl	0.625 µl
DTTP 10 mM	0.375 µl	0.625 µl	0.625 µl
Biotin-16-UTP 0,1mM	2.5 µl
H ₂ O	x	x	x
GoTaq DNA polimerasi	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
Volume TOT	25 µl	25 µl	25 µl

Di seguito sono inoltre riportati i cicli termici ai quali sono state sottoposte le miscele di reazione:

94°C x 5'
 94°C x 45" }
 55°C x 45" } 30 cicli
 72°C x 45" }
 72°C x 7"

L'amplicone biotinilato è stato così separato mediante elettroforesi su gel di agarosio, purificato e quantificato, al fine di ottenere circa 600 ng di sonde biotinilate per l'identificazione rispettivamente di LTP presenti in buccia ed in polpa di pomodoro.

Precedentemente alla fase di ibridazione la membrana è stata preibridata con 1.5 µg di *Salmon sperm DNA*, la cui funzione è quella di permeare in modo aspecifico a tutte le regioni della membrana, evitando così un'interazione inappropriata della sonda.

L'ibridazione consiste in un primo momento nell'esposizione della membrana alla sonda biotinilata preventivamente denaturata, per 2 ore a 68°C, e successivamente in una serie di lavaggi in condizioni sempre più stringenti, dapprima con SSC 2x (Citrato di Sodio 30 mM,

NaCl 0.3 M) + SDS 0.1% e successivamente con SSC 0.1X (Citrato di Sodio 1.5 mM, NaCl 150 mM) + SDS 0.1%. Al fine di rilevare la sonda biotinilata eventualmente ibridata con la sequenza *target* di mRNA, si sfrutta il legame forte e specifico della Biotina alla Streptavidina, nella fattispecie Streptavidina-IR Dye 680, proteina coniugata con un gruppo fluoroforo che, opportunamente eccitato (assorbimento massimo a 680 nm), emette luce mediante fluorescenza.

La membrana, esposta alla soluzione contenente Streptavidina (Concentrazione finale 1%) per 30 minuti a temperatura ambiente, è stata successivamente lavata con PBS 1X (Cloruro di Sodio 137 mM, Cloruro di Potassio 2.7 mM, Sodio Fosfato dibasico 10 mM, Potassio fosfato monobasico 2 mM) + TWEEN 20 0.1% e PBS1X.

I segnali così emessi corrispondenti a mRNA ibridati con sonda biotinilata sono stati acquisiti mediante scansione delle membrane con Scanner Odyssey (LI-COR Biosciences)

4.PREPARAZIONE DELLE SONDE SPECIFICHE PER LE SINGOLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LE LTP DI POMODORO (3'-*Rapid Amplification of cDNA ends*)

Una volta identificato il livello di espressione tissutale delle LTP di pomodoro, si è deciso di valutare la distribuzione delle isoforme di LTP nei vari tessuti di pomodoro. A tale scopo è stata considerata nuovamente l'analisi Northern Blotting e in particolare la preparazione di sonde specifiche per le singole sequenze codificanti per le LTP di pomodoro. Per poter identificare delle regioni discriminanti fra le isoforme di LTP di pomodoro, in particolare le regioni non tradotte all'estremità 3' della sequenza codificante (*UTR*), si è proceduto con l'allineamento delle sequenze complete depositate in banca dati Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Per quanto riguarda le isoforme AM051295 e AM051296, delle quali la sequenza completa non risultava depositata in banca dati, si è proceduto con la *Rapid Amplification of cDNA ends* (RACE 3'), una tecnica che consente di estendere la porzione di sequenza di un mRNA nella fattispecie all'estremità 3'. 1 µg di RNA totale di buccia di pomodoro e 2 µl di primer polyT ancorato BM106 (attB2-Smart I 5'-ACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTACT(30)VN-3') sono stati utilizzati in una reazione di retrotrascrizione per ottenere il corrispondente cDNA con un *primer* ancorato all'estremità 5'. A sua volta il cDNA ottenuto è stato utilizzato in una TOUCH-DOWN PCR, utilizzando 1.25 U di enzima GoTaq polimerasi (5U/ µl), *primers* specifici per l'amplificazione della sequenza

AM051296 (AM051295 plus 5'-ATGGAAATGGTTAACAAGATTGC-3' e attB2-SmartII 5'-GGCGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGT-3') e della sequenza AM051295 ((AM051296 plus 5'-ATGGAAATGTTTGGAAAAATTGCA-3' e attB2-Smart II BM108 minus 5'-GGCGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGT-3'). Il frammento così amplificato è stato inserito nel vettore pGEM-T-Easy (Promega) ed il costrutto risultante è stato utilizzato per elettroporare cellule di *E.coli* del ceppo XL1Blue. I plasmidi ricombinanti sono stati recuperati dalle singole colonie e sequenziati in entrambe le direzioni presso BMR Genomics di Padova.

RISULTATI E DISCUSSIONE II PARTE

1.IDENTIFICAZIONE DELLE ISOFORME DI LTP DI POMODORO

1.1.Clonaggio dei cDNA codificanti per nsLTP di pomodoro e sequenziamento

I cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione dell'mRNA estratto dalla buccia delle quattro varietà di pomodoro analizzate sono stati clonati nel vettore pGEM-T-Easy e sottoposti a sequenziamento presso il centro BMR Genomics di Padova. Una volta verificata mediante Northern Blotting la maggior distribuzione delle nsLTP di pomodoro nella buccia di tutte le varietà analizzate, si è voluto valutare l'abbondanza relativa delle singole isoforme nella buccia di pomodoro delle varietà Marinda, Lancelot Insalatario, San Marzano e Piccadilly.

A tale scopo è stato selezionato un campione rappresentativo di 10 cloni ricombinanti per ciascuna varietà di pomodoro, è stato sequenziato e le sequenze ottenute sono state allineate con quelle note depositate in banca dati mediante il *software* Clustal X.

In generale nelle varietà di pomodoro analizzate sono state identificate tutte le sequenze codificanti per LTP di pomodoro depositate in banca dati con i seguenti *accession number*: X56040, AM051296, AM051295 e AK224707. Tali sequenze risultano significativamente differenti fra di loro, pur avendo regioni altamente conservate, e mostrano una percentuale di identità variabile fra il 76% e 83%. In particolare nella varietà Piccadilly sono state identificate unicamente le sequenze AK224707 e AM051295, la prima con un'abbondanza del 80%; anche la varietà San Marzano ha mostrato una distribuzione delle isoforme identica a quella riscontrata nella varietà Piccadilly. Nel caso della varietà Marinda sono state identificate tutte le sequenze eccetto la AM051296, e quella prevalente risulta essere l'isoforma AM051295. Infine l'unica varietà in cui sono state identificate tutte e quattro le sequenze note di LTP di pomodoro risulta essere Lancelot Insalatario, mostrando una maggior variabilità. Di seguito in Figura 19 sono riportati i dati di abbondanza relativa percentuale delle singole isoforme di LTP di pomodoro nelle quattro varietà botaniche analizzate.

	AK224707	AM051296	AM051295	X56040
Piccadilly	80%	-	20%	-
Marinda	10%	-	80%	10%
Lancelot Insalatario	50%	10%	20%	20%
San Marzano	80%	-	20%	-

Figura 19. Abbondanza relativa percentuale delle isoforme AK224707, AM051296, AM051295 e X56040 nelle varietà di pomodoro Piccadilly, Marinda, Lancelot Insalatario e San Marzano.

E' stata quindi confermata una maggior distribuzione delle nsLTP di pomodoro nella buccia di tutte le cultivar analizzate; inoltre ciascuna varietà botanica è risultata caratterizzata da una diversa abbondanza delle singole isoforme di LTP di pomodoro. Le uniche varietà che hanno mostrato una medesima distribuzione delle isoforme di LTP sono Piccadilly e San Marzano; di conseguenza considerando l'ipotetico ruolo biologico attribuito alle nsLTP e quindi la loro localizzazione *in planta* è probabile che esista una correlazione fra la distribuzione di quest'ultime e fattori quali lo stadio di maturazione, varietà botanica e provenienza geografica.

2.AMPLIFICAZIONE DELLE SEQUENZE INDIVIDUATE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO

2.1.Progettazione dei primers

Dall'analisi del cDNA codificante per LTP di pomodoro estratto dalla buccia di quattro varietà distinte di pomodoro è emerso che sono presenti varie isoforme di LTP di pomodoro, in particolare ne sono state individuate quattro le cui sequenze risultano depositate in banca dati NCBI Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) con i seguenti *accession number*: AM051296, AM051295, X56040 e AK224707. Disponendo quindi della sequenza delle isoforme individuate, si è proceduto con la progettazione di *primers* specifici necessari per reazioni di PCR mirate all'amplificazione delle regioni codificanti complete delle isoforme sopraccitate. La lunghezza dei *primers plus* e *minus* è stata determinata calcolando le temperature di appaiamento, che risultavano in genere comprese fra 60°C e 55°C; per ciascuna coppia è stata

scelta la temperatura di appaiamento più bassa da impostare nei cicli termici di PCR. I *primers* mostravano un contenuto %GC e temperature di appaiamento simili, inoltre si è proceduto in modo tale da limitare i fenomeni di autoappaiamento e di appaiamento fra i *primers* stessi.

2.2. Amplificazione delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro

I primers progettati sono stati utilizzati per allestire reazioni di PCR utilizzando come template il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione di RNA estratto dalla buccia di pomodori insalatari della varietà Lancelot. A seguito della reazione di PCR i campioni sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica su gel di agarosio 0.8%; l'amplificazione ha avuto esito positivo ed ha permesso di evidenziare bande elettroforetiche corrispondenti ad ampliconi di dimensione comprese fra 200 e 400 pb. In figura 20 sono riportati gli amplificati delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro di dimensioni pari a 345 pb.

Gli ampliconi ottenuti sono stati successivamente purificati da gel ed utilizzati per il clonaggio nel vettore pGEM-T-easy .

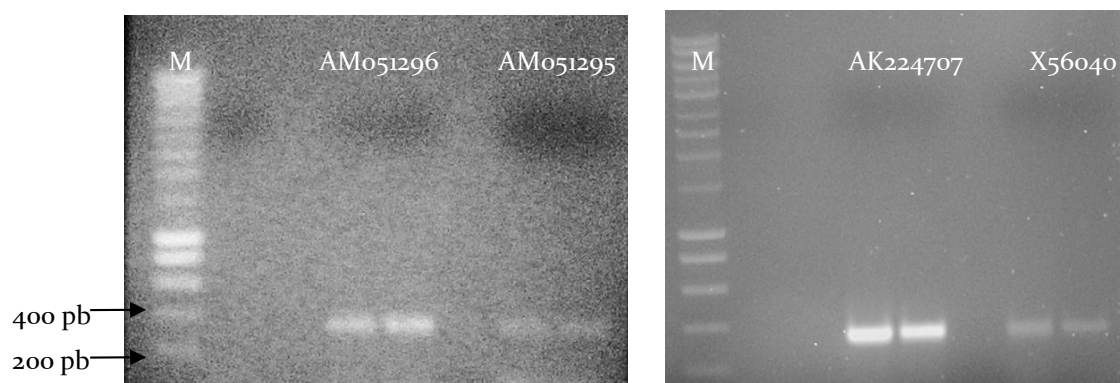


Figura 20. Amplificati delle sequenze ottenuti impiegando primer specifici per le LTPs di pomodoro indicate in figura.

2.3. Clonaggio delle sequenze amplificate nel vettore pGEM-T-easy

Al fine di ottenere un plasmidio ricombinante pGEM-cDNA LTP di pomodoro, i frammenti purificati da gel sono stati rispettivamente sottoposti ad una reazione di ligazione seguendo il metodo "T/A cloning". I costrutti ottenuti sono stati introdotti in cellule di *E.coli* ceppo XL1B mediante elettroporazione ed incubate in terreno LB selettivo, addizionato di ampicillina e

tetraciclina e dei reagenti necessari a consentire lo *screening blu-bianco* (X-gal e IPTG). Successivamente all'incubazione si osserverà solo la crescita di cellule resistenti agli antibiotici aggiunti e fra quest'ultime, quelle contenenti il plasmidio ricombinante presenteranno una colorazione bianca. Una volta selezionate le colonie bianche è stato estratto il DNA plasmidico e sottoposto ad analisi di restrizione con l'enzima EcoRI. Tale enzima è in grado di tagliare nei due siti di restrizione a monte ed a valle del sito di clonaggio quindi, il *pattern* di restrizione dei plasmidi ricombinanti è caratterizzato da due bande, una corrispondente a pGEM-T-Easy (circa 3000 pb) ed una corrispondente alle sequenze codificanti per LTP di pomodoro (345 pb).

L'esatta sequenza delle isoforme di LTP di pomodoro clonate in pGEM-T-easy, è stata verificata con sequenziamento Sanger presso BMR-genomics di Padova e le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate in banca dati. Le sequenze ottenute sono risultate identiche a quelle attese.

3. CLONAGGIO DELLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO NEL VETTORE DI ESPRESSIONE pET-11b

3.1. Inserimento dei siti di restrizione per BamHI e NdeI e clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore intermedio pGEM-T-EASY

Il DNA plasmidico ricombinante contenente rispettivamente le sequenze AK224707, AM051296, AM051295 e X56040, è stato utilizzato come template in un'ulteriore reazione di PCR. Tale reazione era finalizzata all'amplificazione della sequenza matura ovvero priva della sequenza segnale. Le LTP di pomodoro presentano una sequenza segnale all'estremità amminoterminale (Tomassen et al, 2007), necessaria per la localizzazione extracellulare della proteina; si è voluto quindi clonare la sequenza nucleotidica corrispondente alla sequenza aminoacidica matura, di dimensioni pari a 285 pb. In figura 21 è riportato l'allineamento delle sequenze aminoacidiche delle LTP di pomodoro in cui è evidenziato il *cleavage site*.

```

      *           20           *           40           *           60           *           80
AM051296 : MEMFCKIACFVVECMVVVAPHAE↓SLSCGEVITSGLAPCLPYLQGRGPLGGCCGGVKGLLGAKTPE*DRKTACTCLKSAANSIRG : 83
AK224707 : MEMSSKIACFIVLCMIVVAPHGEALSCGQVE*SGLAPCLPYLQGRGPLGGCCGGVKGLLGAKTPE*DRKTACTCLKSAANAIRG : 83
X56040 : MEMVSKIACFVLLCMVVVAPHAEALTCGQVIT*SLAPCLPYLQGRGPLGGCCGGVKGLLGSAKTPE*DRKTACTCLKSAANAIRG : 83
AM051295 : MEMVSKIACFVLLCMVVVAPHAEALTCGQVIT*SLAPCLPYLQGRGPLGGCCGGVKGLLGAKTPE*DRKTACTCLKSAANSFTG : 83

      *           100           *
AM051296 : LITGKAAGLFGVCCVNI*IPYKISPSTDCSRVVC : 114
AK224707 : LNLGKAAGLFSACGVST*IPYKISPSTDCSRVVC : 114
X56040 : LIDNKAAGLFSVCFVNI*IPYKISPSTDCSRVVC : 114
AM051295 : LNLGKAAGLFENTCSVNI*IPYKISPSTDCSRVVC : 114

```

Figura 21. Allineamento delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro e cleavage site.

In fase di amplificazione si è voluto inoltre inserire i siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione *NdeI* e *BamHI* rispettivamente all'estremità 5' e 3' per favorire successivamente il corretto clonaggio delle sequenze nel vettore di espressione pET11b. Sono stati quindi progettati primers che non appaiano completamente, in quanto presentano all'estremità 5' siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione sopraccitati.

L'amplificazione ha avuto esito positivo e, come possibile notare in Figura 22, ha permesso di evidenziare bande elettroforetiche corrispondenti ad ampliconi di dimensioni corrispondenti a 285 pb, in questo caso corrispondente alla sequenza X56040.

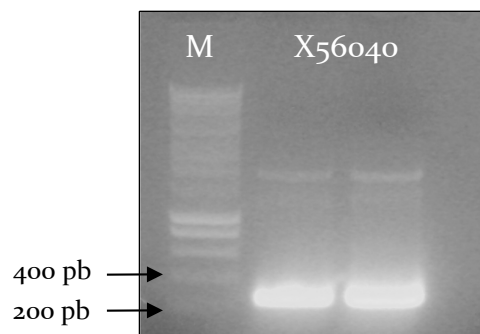


Figura 22. Analisi elettroforetica su gel di agarosio 0.8% dell'amplificato X56040 di dimensioni pari a 285 pb.

I campioni ottenuti dalla reazione di PCR corrispondenti alle quattro isoforme di LTP di pomodoro, dopo essere stati estratti e purificati da gel, sono stati quindi clonati nel vettore intermedio pGEM-T-Easy. La reazione di ligazione ha avuto esito positivo; l'analisi elettroforetica delle reazioni di digestione con *EcoRI* effettuate su DNA plasmidico ricombinante ha permesso di evidenziare una banda corrispondente alle sequenze codificanti per LTP di pomodoro. Le suddette sequenze sono state isolate mediante due reazioni di digestioni rispettivamente con l'enzima *BamHI*, che ha determinato la linearizzazione del plasmide ricombinante e con *NdeI*, che ha permesso di ottenere i frammenti contenenti le

sequenze da inserire nel vettore di espressione pET_{11b}.

3.2. Clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore di espressione pET-11b

I frammenti isolati codificanti per le isoforme di LTP di pomodoro sono stati inseriti nel vettore di espressione pET-11b mediante una reazione di ligazione ed i plasmidi ricombinanti sono stati dapprima utilizzati per trasformare cellule di *E.coli* ceppo XL1B. La reazione di *PCR colony* utilizzando *primers* che appaiano a monte ed a valle dell'inserito ha evidenziato, nel caso dei campioni contenenti il plasmidio ricombinante, la presenza di una banda di dimensioni comprese fra 200 e 400 pb corrispondente alle nsLTP di pomodoro. I costrutti pET_{11b}-nsLTP di pomodoro sono stati sequenziati con metodo Sanger presso la BMR Genomics di Padova ed utilizzati per la trasformazione chimica di cellule *E.coli* ceppo BL21 Origami adatte all'espressione proteica.

4. ESPRESSIONE IN FORMA RICOMBINANTE DELLE ISOFORME DI LTP DI POMODORO

4.1. Prova di induzione e solubilità e ottimizzazione delle condizioni di espressione

Per l'espressione delle nsLTP di pomodoro si è scelto di utilizzare il ceppo BL21 Origami di *E.coli*, poiché tale sistema di espressione procariotico presenta mutazioni nei geni tioredossina riduttasi (*trxB*) e glutatione riduttasi (*gor*) tali da favorire un ambiente non riducente e quindi adatto alla formazione dei ponti disolfuro ed al *folding* corretto per proteine quali nsLTP, che contengono quattro ponti disolfuro. L'induzione con IPTG si è protratta per 24 ore a tre differenti temperature al fine di verificare l'optimum di espressione delle nsLTP di pomodoro. L'analisi elettroforetica SDS-PAGE delle proteine cellulari totali ha evidenziato una banda corrispondente al peso molecolare atteso per LTP di pomodoro (circa 9kDa), assente nella coltura batterica non indotta; in particolare tale banda è risultata più intensa nei campioni indotti a 28°C.

Applicando quindi le condizioni di induzione ottimizzate (28°C per 24 ore), le isoforme di LTP di pomodoro risultavano relativamente più abbondanti rispetto alle proteine espresse da

E.coli e presenti unicamente in forma solubile.

In figura 23 è riportata l'analisi elettroforetica SDS-PAGE relativamente al campione X56040 delle proteine cellulari totali del campione indotto, non indotto e delle frazioni solubile e insolubile ottenute dopo lisi cellulare.

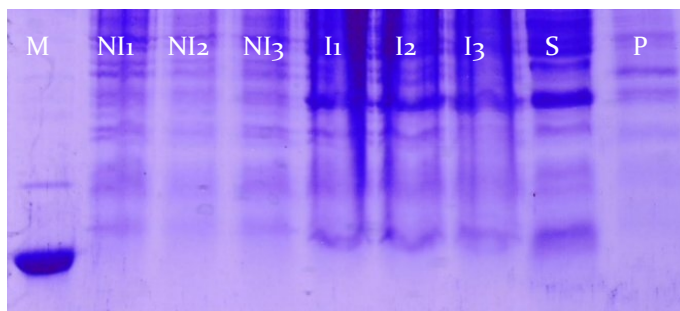


Figura 23. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle proteine della coltura batterica non indotta (NI) e indotta (I) e le frazioni solubili (S) e insolubili (P) ottenute dopo lisi cellulare dell'isoforma X56040 di LTP di pomodoro.

5. PURIFICAZIONE DELL'ISOFORMA X56040 DI LTP DI POMODORO

Si è inizialmente proceduto con la purificazione dell'isoforma X56040 di LTP di pomodoro.

Il surnatante ottenuto dopo lisi cellulare del campione contenente LTP di pomodoro è stato sottoposto a concentrazione delle proteine cellulari totali e purificazione mediante metodo cromatografico. La prima fase di ultrafiltrazione in cella Amicon (*cut-off* 3000 Da) ha permesso di concentrare le proteine totali di peso molecolare superiore ai 3000 Da e successivamente, nella seconda fase di cromatografia a scambio cationico, è stato possibile separare la proteina di interesse dai peptidi e proteine presenti nel surnatante. Le frazioni eluite dalla colonna sono state sottoposte ad analisi elettroforetica, in figura 24 sono infatti riportate le frazioni raccolte dopo cromatografia a scambio cationico contenenti l'isoforma X56040.

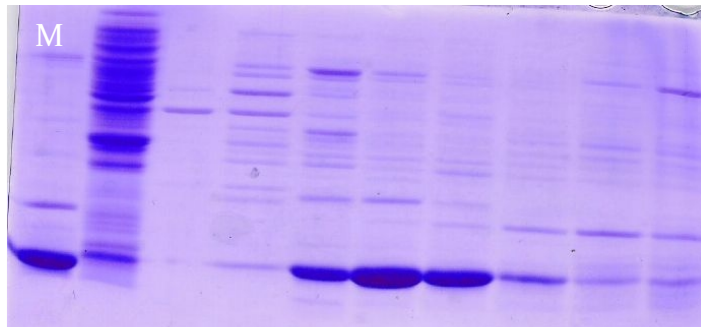


Figura 24. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle frazioni raccolte dopo cromatografia a scambio cationico. M: marker di peso molecolare di circa 9000 Da.

Le frazioni eluite dalla colonna e corrispondenti alla proteina nsLTP X56040 di pomodoro hanno mostrato un picco proteico con un massimo di assorbimento a 280 nm.

6.CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELL'ISOFORMA X56040 DI LTP DI POMODORO

6.1.Prove di legame della lisolecitina lyso C₁₆ a LTP di pomodoro

Al fine di verificare che la nsLTP X56040 di pomodoro prodotta in forma ricombinante, fosse funzionalmente attiva è stata studiata la sua capacità di legare lisolecitina 1-palmitoil-2-lisofosfatidilcolina (LisoC₁₆). È stato quindi utilizzato l'aumento della fluorescenza per studiare l'interazione del composto lipidico con le nsLTP. Già in passato diversi studi avevano individuato un residuo di tirosina presente all'estremità C-terminale responsabile dell'aumento di fluorescenza; si è pensato infatti che la fluorescenza di questo residuo, collocato all'estremità della cavità idrofobica che accoglie composti lipidici, con la funzione di chiudere tale cavità nella forma complessata, aumentasse in modo significativo a seguito del legame con LisoC₁₆.

Come è possibile notare in figura 25, con l'aggiunta di LysoC₁₆ a nsLTP di pomodoro ricombinante si è verificato un aumento di intensità di fluorescenza di circa il 38% a 310 nm, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 275 nm. Si può quindi affermare che la proteina espressa possiede la capacità tipica delle nsLTP di legare composti lipofili, risultando pertanto funzionalmente attiva. Inoltre osservando lo spettro dell'isoforma X56040 prima dell'aggiunta di Lyso C₁₆ è possibile notare una spalla a circa 340 nm, ad indicare la possibile

interazione della proteina ricombinante con molecole probabilmente presenti nel terreno di coltura.

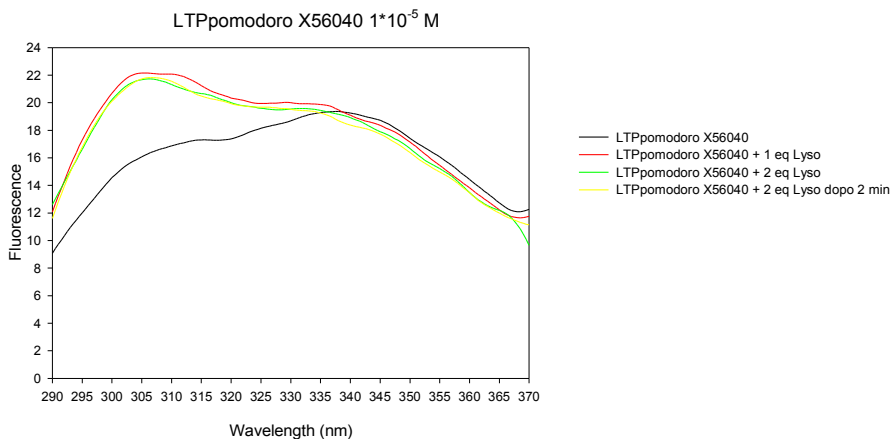


Figura 25. Analisi dell'interazione tra nsLTP X56040 di pomodoro e LysoC16 mediante misure di fluorescenza.

6.2. Misure di dicroismo circolare

La struttura secondaria di nsLTP X56040 di pomodoro è stata analizzata mediante misure di dicroismo circolare nel lontano UV. Gli spettri di dicroismo circolare raccolti a temperatura ambiente erano caratterizzati da due minimi rispettivamente a 208 e 220 nm, confermando la tipica struttura ad α -elica delle nsLTP naturali.

Al fine di valutare la stabilità termica della nsLTP di pomodoro e quindi la resistenza di queste proteine ai trattamenti tecnologici, sono stati registrati i valori di ellitticità molare a temperature crescenti, in particolare da 25°C a 105°C. Le prove sono state effettuate a due differenti pH rispettivamente neutro con tampone PBS (pH 7.4) ed anche acido con tampone sodio acetato (pH 4.3), al fine di riprodurre le condizioni fisico-chimiche dei prodotti a base di pomodoro. Mantenendo il pH acido sono stati inoltre registrati spettri di dicroismo circolare riscaldando la proteina direttamente da 25°C a rispettivamente 85°C e 95°C e riportando successivamente la temperatura al valore di partenza. Di seguito (Figura 26, 27) sono quindi riportati i grafici di dicroismo circolare nel lontano UV dell'isoforma X56040 di LTP di pomodoro a pH neutro ed acido, riscaldando gradualmente da 25°C a 105°C e a pH acido riscaldando direttamente da 25°C a 85°C e 95°C (Figura 28, 29).

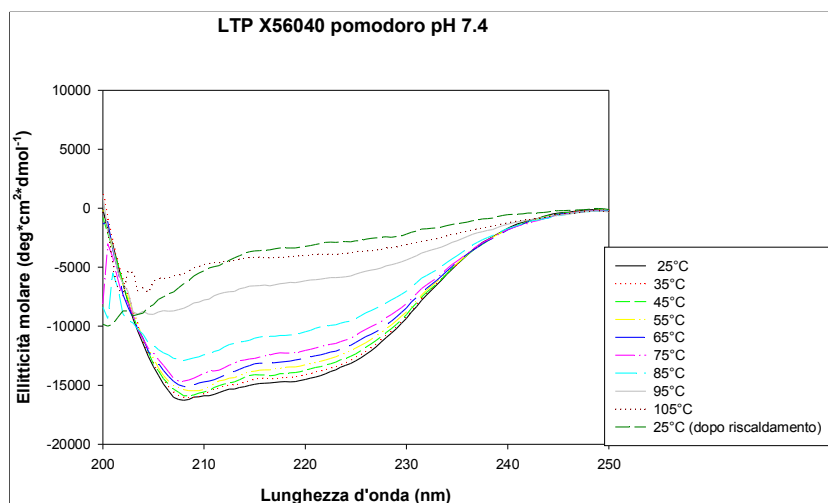


Figura 26. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV di LTP X56040 di pomodoro durante il riscaldamento da 25°C a 105°C a pH 7.4.

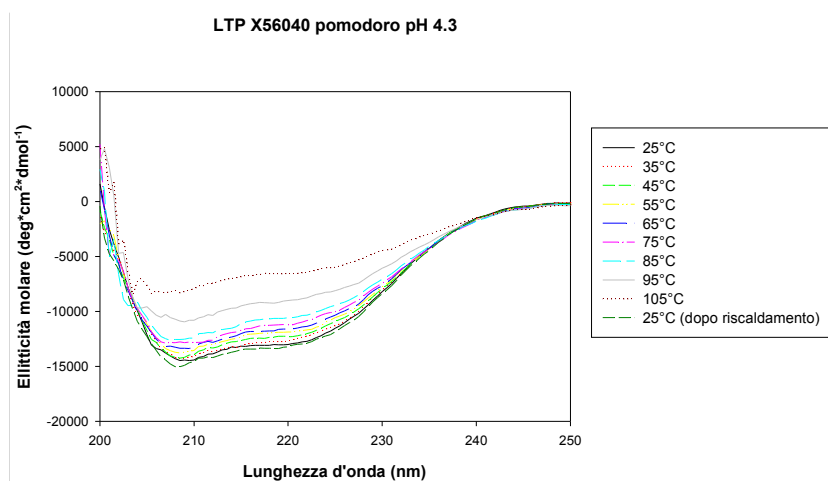


Figura 27. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV di LTP X56040 di pomodoro durante il riscaldamento da 25°C a 105°C a pH 4.3.

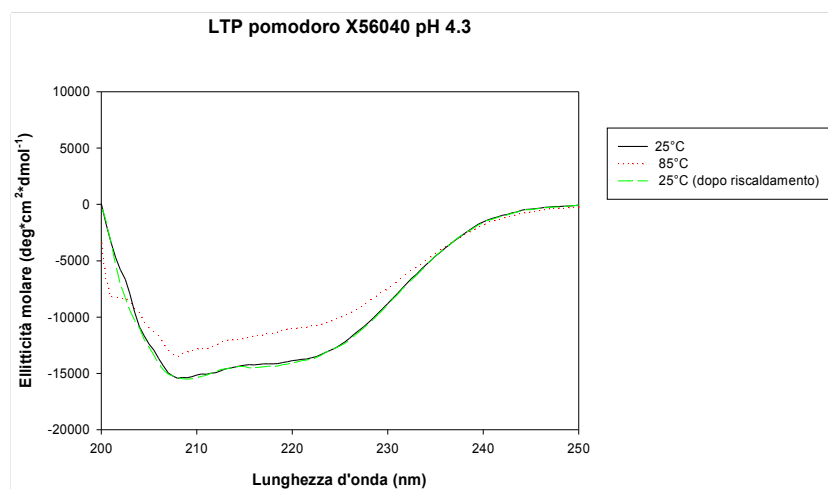


Figura 28. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV di LTP X56040 di pomodoro durante il riscaldamento da 25°C a 85°C a pH 4.3.

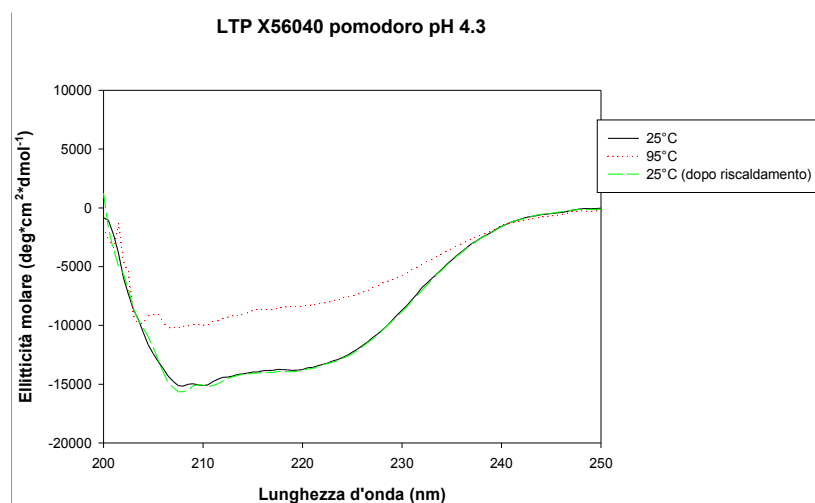


Figura 29. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV di LTP X56040 di pomodoro durante il riscaldamento da 25°C a 95°C a pH 4.3.

Analizzando i grafici riportati è possibile osservare che sia a pH neutro che acido la proteina in esame perde gradualmente la struttura secondaria registrando variazioni progressive dei valori di ellitticità molare; in particolare tale effetto risulta più marcato riscaldando la proteina fino a 105°C a pH neutro. In seguito al raffreddamento a 25°C solo nel caso del campione a pH acido, la proteina è in grado di recuperare quasi completamente lo spettro CD, mostrando quindi la capacità di rinaturare a seguito di trattamenti termici. Il riscaldamento diretto a 85°C e 95°C a pH acido ed il successivo raffreddamento a 25°C, evidenzia l'abilità dell'isoforma X56040 di riacquistare il *fold* originario e pertanto è possibile affermare che la nsLTP X56040 di pomodoro è un allergene potenzialmente attivo che potrebbe scatenare reazioni avverse in pazienti sensibili alle LTP di pomodoro, anche successivamente a trattamenti termici effettuati a pH acidi (ad esempio trattamenti di pastorizzazione della passata di pomodoro). Precedenti studi condotti su nsLTP di pesca e mela confermano che i trattamenti termici effettuati a pH acido, comportano una denaturazione termica reversibile della proteina; a contrario è stato ipotizzato che i trattamenti in condizioni di neutralità, comportano la scissione dei ponti disolfuro, la β -eliminazione del protone della cisteina con conseguente formazione di nuovi legami disolfuro intermolecolare che stabilizzano la struttura proteica. Le variazioni di ellitticità molare osservate a 220 nm negli esperimenti condotti hanno consentito di descrivere l'andamento del valore di denaturazione percentuale nel corso del riscaldamento fino a 105°C sia dell'isoforma X56040 di LTP di pomodoro (pH 4.3 e pH 7.4) che di Pru p 3 (pH 7.4). Come è possibile notare in Figura 30 in tutti i casi,

riscaldando da 25°C a 105°C si osserva denaturazione, che sembra procedere più rapidamente nell'intervallo di temperatura compreso fra 85°C e 95°C; inoltre Pru p 3 si mostra leggermente più stabile rispetto a Lyc e 3, sia considerando gli esperimenti condotti a pH 4.3 che quelli condotti a pH 7.4. A conferma di ciò, è stata stimata la temperatura di *melting* (T_m), ovvero la temperatura alla quale il 50% delle proteine risulta denaturato, per l'isoforma X56040 (T_m di circa 87°C e 90°C rispettivamente a pH 7.4 e 4.3) e per Pru p 3 (T_m di circa 94°C a pH 7.4).

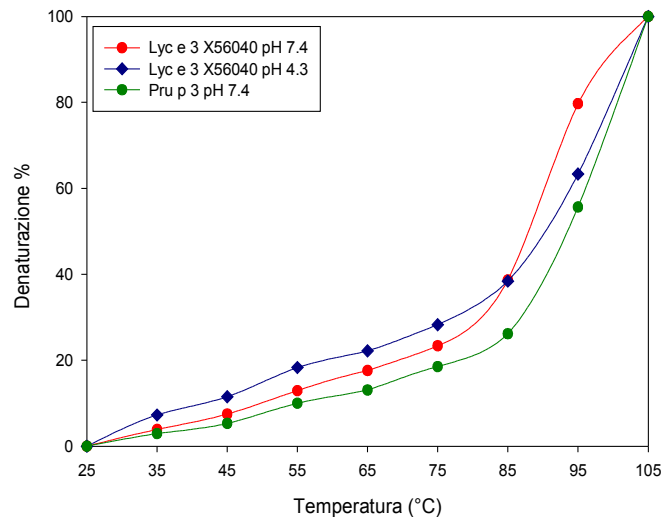


Figura 30. Denaturazione termica percentuale di Lyc e 3 (pH 7.4 e pH 4.3) e di Pru p 3 (pH 7.4).

7.CARATTERIZZAZIONE DELL'ISOFORMA X56040 LTP DI POMODORO COME ALLERGENE

7.1.Saggio di ELISA INHIBITION (Metodo ISAC-Immuno Solid-phase Allergen chip)

La reattività immunologica della nsLTP X56040 di pomodoro è stata studiata mediante saggi di *ELISA inhibition* con sistema ISAC (ImmunoSolid-phase Allergen chip), in collaborazione con l'Istituto Dermatopatico dell'Immacolata IRCCS di Roma. Mediante tali prove è stata verificata la capacità della LTP di pomodoro X56040 di inibire la reattività delle IgE di sieri di di pazienti allergici a LTP di pesca verso LTP di diversa origine immobilizzate su appositi chip. Come è possibile notare in figura 31, nell'esperimento sono stati utilizzati due *chip* diversi, ciascuno contenente diverse LTP naturali purificate da diverse fonti vegetali. Gli esperimenti

sono stati condotti con sieri singoli o con pool di sieri, di seguito sono riportati unicamente i dati corrispondenti all'esperimento effettuato con *pool* di sieri di pazienti allergici a Pru p 3 in quanto considerati più significativi. Gli inibitori utilizzati sono Lyc e 3 (isoforma X56040) prodotta in forma ricombinante e come controllo positivo Pru p 3 naturale estratta da pesca; è possibile quindi osservare che in presenza dell'inibitore Pru p 3 si ha sempre un'inibizione totale o quasi della reattività IgE, in quanto il valore di OD riportato è prossimo allo zero. Diversamente in presenza di Lyc e 3 come inibitore si osserva in tutti i casi una diminuzione del valore di OD rispetto al corrispondente controllo negativo; tale diminuzione è stata quantificata come inibizione percentuale ottenuta dalla seguente formula: $(OD_{\text{Controllo negativo}} - OD_{\text{Lyc e 3}}) / OD_{\text{Controllo negativo}} * 100$; dove $OD_{\text{Lyc e 3}}$ corrisponde al segnale ottenuto in presenza dell'inibitore Lyc e 3, mentre $OD_{\text{Controllo negativo}}$ corrisponde al segnale ottenuto in assenza del suddetto inibitore. Solo nel caso dell'allergene Par j 2 non si osserva una diminuzione significativa del segnale, la reattività costante di Par j 2 anche in presenza del controllo positivo con Pru p 3 è evidentemente legata al fatto che si tratti di una LTP2.

	Chip 1 Controllo negativo	Chip2 Controllo negativo	Chip1 Inibitore Lyc e 3 X56040 1 mg/ml	Chip2 Inibitore Lyc e 3 X56040 1 mg/ml	Chip 1 Inibitore Pru p 3 1 mg/ml	Chip 2 Inibitore Pru p 3 1 mg/ml
Act c 10	0.49		0.32		0	
Act d 10	0.34		0.24		0	
Art v 3		1.61		0.31		0.35
Cor a 8.0101		1.82		0.68		0
Mor n 3	5.95		3.5		0.04	
Par j 2		6.7		5.48		5.96
Pru p 3	7.28	3.68	2.83	1.87	0	0.16

Figura 31. OD ottenuti nei test Elisa inhibition metodo ISAC per rLyc e 3 Pru p 3 naturale.

I dati di inibizione percentuali sono stati riportati in figura 32 ed i risultati mostrano una inibizione superiore al 50% verso LTP di artemisia, nocciola e pesca e valori inferiori per le altre specie considerate. Il confronto di questi dati con quelli ottenuti impiegando LTP di pesca come inibitore indicano una condivisione di alcuni epitopi IgE reattivi; tuttavia la LTP di pomodoro analizzata è ricombinante mentre Pru p 3 è stata estratta da fonti naturali e talvolta le proteine ricombinanti prodotte non hanno un ripiegamento perfetto causando la "scomparsa" di alcuni epitopi; sarebbe quindi interessante disporre di Lyc e 3 (isoforma X56040) estratta da pomodoro da utilizzare come controllo naturale nei test di inibizione.

Allergene	Fonte	% inibizione LTP pomodoro	% inibizione LTP pesca
Act c 10	Kiwi gold (<i>Actinidia chinensis</i>)	34.69	100
Act d 10	Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	29.41	100
Art v 3	Artemisia (<i>Artemisia vulgaris</i>)	80.75	78.26
Cor a 8	Nocciola (<i>Corylus avellana</i>)	62.64	100
Mor n 3	Gelso (<i>Morus nigra</i>)	41.18	99.33
Par j 2	Parietaria (<i>Parietaria judaica</i>)	18.21	11.04
Pru p 3	Pesca (<i>Prunus persica</i>)	61.13	100

Figura 32. Inibizione percentuale ottenuta nei test Elisa inhibition metodo ISAC per rLyc e 3 e Pru p 3 naturale.

8. ESPRESSIONE IN FORMA RICOMBINANTE E PURIFICAZIONE DELLE ISOFORME AK224707, AM051295 E AM051296 DI LTP DI POMODORO

8.1. Induzione e purificazione dell'isoforma AK224707 di LTP di pomodoro

L'isoforma AK224707, clonata nel vettore di espressione pET11B e inserita nel sistema di espressione procariotico *E.coli* ceppo BL21 Origami, è stata indotta nelle condizioni adottate precedentemente per l'isoforma X56040 (28°C per 24 ore, IPTG 1 mM) e le proteine della coltura batterica indotta e non indotta sono state analizzate mediante SDS-PAGE; l'analisi elettroforetica ha evidenziato bande corrispondenti al peso atteso per LTP di pomodoro nell'indotto, inoltre la proteina è risultata essere presente nella frazione solubile ottenuta dopo lisi cellulare (Figura 33)

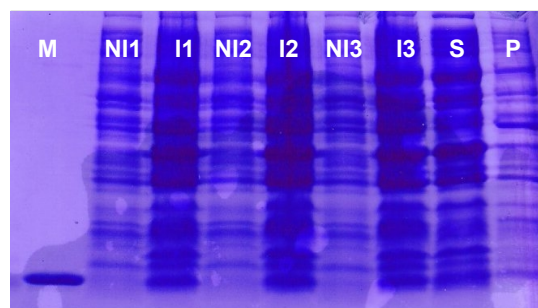


Figura 33. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle proteine della coltura batterica non indotta (NI) e indotta (I) e le frazioni solubili (S) e insolubili (P) ottenute dopo lisi cellulare dell'isoforma AK224707 di LTP di pomodoro.

Il surnatante così ottenuto è stato concentrato mediante ultrafiltrazione in cella Amicon (3000 Da) e sottoposto a purificazione cromatografica. Le frazioni eluite da cromatografia a scambio cationico sono state analizzate mediante SDS-PAGE; in figura 34 è possibile osservare l'analisi elettroforetica delle frazioni raccolte contenenti l'isoforma AK224707 di LTP di pomodoro. Le frazioni ottenute vengono riunite e concentrate ai fini della quantificazione spettrofotometrica e della determinazione della massa esatta mediante spettrometria di massa.

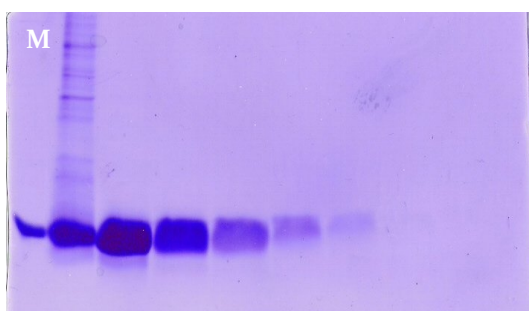


Figura 34. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle frazioni raccolte dopo cromatografia a scambio cationico. M: marker di peso molecolare di circa 9000 Da.

8.2.Induzione e purificazione delle isoforme AM051295 e AM051296 di LTP di pomodoro

Sono state effettuate prove di espressione anche nel caso delle isoforme AM051295 e AM051296, l'induzione è avvenuta a 28°C per 24 ore come spiegato precedentemente, e mediante analisi SDS-PAGE delle proteine cellulari totali è stata evidenziata la presenza di una banda più marcata in corrispondenza del peso molecolare atteso per LTP di pomodoro nel campione indotto relativo all'isoforma AM051296. In figura 35 è riportata a relativa 'analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE).

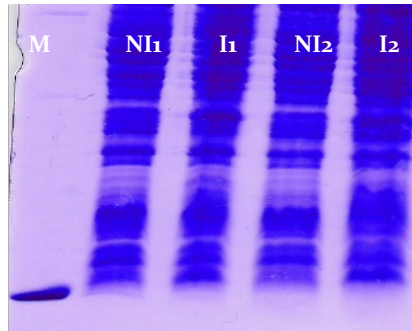


Figura 35. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle proteine della coltura batterica non indotta (NI) e indotta (I) rispettivamente di AM051295 ed AM51296.

Si è deciso quindi di procedere con la purificazione dell'isoforma AM051296, adottando le tecniche cromatografiche utilizzate precedentemente; in primo luogo è stata verificata la presenza dell'isoforma AM051296 nella frazione solubile ottenuta a seguito di lisi cellulare, e quest'ultima concentrata in modo tale da ottenere un volume idoneo per la cromatografia a scambio cationico. La figura 36 evidenzia quindi le frazioni dell'isoforma AM051296 raccolte durante la fase di purificazione cromatografica.

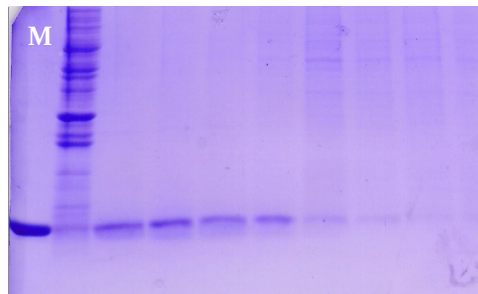


Figura 36. Analisi elettroforetica in gel denaturante (SDS-PAGE) delle frazioni raccolte dopo cromatografia a scambio cationico. M: marker di peso molecolare di circa 9000 Da.

MATERIALI E METODI II PARTE

1. IDENTIFICAZIONE DELLE ISOFORME DI LTP DI POMODORO

1.1. Clonaggio dei cDNA codificanti per nsLTP di pomodoro e sequenziamento

I cDNA ottenuti precedentemente dalla retrotrascrizione del RNA estratto rispettivamente dalla buccia delle varietà di pomodoro Marinda, Piccadilly, Lancelot insalatario e San Marzano sono stati clonati nel vettore plasmidico pGEM-T-Easy mediante “T/A cloning” al fine di ottenere il costrutto pGEM-cDNA LTP di pomodoro.

Quindi 180 ng di cDNA purificato vengono aggiunti ad una miscela di reazione contenente 25 ng di vettore pGEM-T-Easy (50 ng/μl), 1.5 U di T4 DNA Ligasi (3U/ μl) e Buffer di reazione 2X (Volume totale 10 μl). Successivamente il costrutto purificato mediante precipitazione con acetato di sodio (1/10 di volume di acetato di sodio 3 M pH 5.2, 3 volumi di etanolo 96% e 0.5 μL di glicogeno 40 mg/ml) a -80°C per 30 minuti, è stato inserito in cellule batteriche di *E.coli* del ceppo XL1B mediante elettroporazione. È stato così selezionato un campione rappresentativo di 10 cloni ricombinanti, a loro volta individuati mediante *screening blu-bianco* e analisi del pattern di restrizione con EcoR1, per il sequenziamento e identificazione delle sequenze di LTP di pomodoro. Il DNA plasmidico estratto dalle colonie ricombinanti è stato sequenziato con metodo Sanger presso la BMR Genomics di Padova.

Le sequenze ottenute corrispondente ai 10 cloni ricombinanti di ogni varietà di pomodoro e quelle depositate in banca dati sono state confrontate mediante allineamento multiplo con il software ClustalX.

2.AMPLIFICAZIONE DELLE SEQUENZE INDIVIDUATE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO

2.1.Progettazione di *primers*

Per l'amplificazione attraverso la reazione di PCR delle sequenze d'interesse è risultato necessario il disegno di *primers*, oligonucleotidi specifici che forniscono un punto d'innescio per la DNA polimerasi. A tale scopo è stato progettato un *primer plus* che appaia all'estremità 3' del filamento da amplificare ed un *primer minus* che appaia all'estremità 3' del filamento complementare, per ciascuna sequenza da amplificare.

La temperatura di *annealing*, ovvero la temperatura di appaiamento dei *primers*, è calcolata attraverso la formula: $[(4*GC)+(2*AT)] -5^{\circ}C$.

In genere la temperatura ottimale è compresa fra 52 e 62°C.

X56040 plus 5'-ATGGAAATGGTTAGCAAAATTGC-3'

X56040 minus 5'-TTACTGAACCGTGGAGCAGTCA-3'

AK22040 plus 5'-ATGGAAATGTGTAGCAAAATTGC-3'

AK22040 minus 5'-TTACTGAACCTTCGAGCAGTCA-3'

AM051295 plus 5'-ATGGAAATGGTTAACAAGATTGC-3'

AM051295 minus 5'-TTACTGAACCTTTAGAACAGTCAG-3'

AM051296 plus 5'-ATGGAAATGTTTGGAAAAATTGCA-3'

AM051296 minus 5'-TTACTGGACCGTTGAGCAATC-3'

2.2.Amplificazione delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro

La reazione di PCR (*Polymerase-chain reaction*) condotta mediante l'impiego di Go Taq DNA polimerasi (Promega) è stata realizzata impiegando i seguenti reagenti: 1 µl *primer plus* (25 µM), 1 µl *primer minus* (25 µM), 4 µl miscela dNTPs (2.5 µM), 10 µl di tampone di reazione

Green Go Taq 5X, 0.2 Go Taq DNA polimerasi (5 unità/ μ l) e 0.5 μ l di cDNA template (volume finale 50 μ l).

Inoltre sono stati applicati i seguenti cicli termici:

94°C	4'	} 30 CICLI
94°C	45''	
T _{annealing}	45''	
72°C	20''	
72°C	7'	

Terminata la reazione di PCR, è stata verificata l'avvenuta amplificazione mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio 0.8%.

2.3. Purificazione dell'amplificato

La separazione elettroforetica su gel di agarosio può essere impiegata, oltre che per la visualizzazione del prodotto di PCR, anche per la sua purificazione.

È stato caricato il volume totale di amplificato su gel di agarosio; la banda corrispondente all'amplicone di dimensione corretta è stata tagliata dal gel ed il DNA estratto attraverso cicli di congelamento-scongelo rapido del gel, estrazione con Fenolo-Cloroformio (1:1) e precipitazione degli acidi nucleici con acetato di sodio (1/10 di volume di acetato di sodio 3 M pH 5.2, 3 volumi di etanolo 96% e 0.5 μ l di glicogeno 40 mg/ml) a -80°C per 30 minuti. Il DNA così purificato, lavato con etanolo 70%, è stato nuovamente caricato su gel di agarosio 0.8%, al fine di quantificare l'inserto.

3. CLONAGGIO DELLE SEQUENZE CODIFICANTI PER LTP DI POMODORO NEL VETTORE DI ESPRESSIONE pET-11b

3.1. Clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore intermedio pGEM-T-Easy

La Go Taq polimerasi utilizzata per la reazione di PCR, ed altre DNA polimerasi termostabili (es. *Tth* polimerasi), originano prodotti di PCR aventi al 3' un residuo di adenina sporgente. Questa attività è sfruttata nel metodo "T/A cloning", che permette il clonaggio di tali prodotti di PCR in vettori con residui di T sporgenti, quale il vettore plasmidico pGEM-T-Easy.

Al fine di ottenere il vettore intermedio pGEM-LTP di pomodoro, le sequenze di cDNA codificanti per LTP di pomodoro sono state sottoposte a reazione di ligazione utilizzando 3 U di enzima T₄ DNA ligasi (3U/μl). Il costrutto ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo XL1 Blue; il trasferimento di plasmidi all'interno delle cellule batteriche avviene tramite elettroporazione. I cloni positivi, cioè contenenti il plasmidio ricombinante, sono stati selezionati mediante *screening blu-bianco* e mediante analisi di restrizione con le endonucleasi EcoR₁ (che presenta due siti di restrizione sul vettore a monte ed a valle dell'inserito).

3.2. Inserimento dei siti di restrizione per BamHI e NdeI e clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore intermedio pGEM-T-Easy

Ai fini della produzione di una proteina eterologa allo stato nativo è necessario collocare il gene corrispondente all'interno del vettore di espressione, ovvero il sito di clonaggio deve permettere una corretta collocazione del codone di *start* (ATG) rispetto al sito di riconoscimento del ribosoma dell'ospite procariotico (sequenza Shine-Dalgarno). Nel vettore di espressione pET-11b, questo è facilitato dalla presenza di siti unici di restrizione *BamHI* e *NdeI* collocati nella regione promotrice T₇ alla distanza ottimale dalla sequenza Shine-Dalgarno. A tale scopo le sequenze codificanti per LTP di pomodoro sono state modificate mediante PCR, utilizzando *primers* mismatch non totalmente complementari, progettati per l'inserimento dei siti di restrizione *NdeI* e *BamHI* rispettivamente all'estremità 5' e all'estremità 3' del cDNA-LTP di pomodoro. Sono di seguito riportate le sequenze dei *primers*

disegnati:

AM051296

Plus 5'-CATATGCTGAGCTGCGGCGAG-3'	1°T=47°C	2°T=63°C
Minus 5'-GGATCCTTACTGGACCGTTGAG-3'	1°T=43°C	2°T=63°C

AK224707

Plus 5'-CATATGCTAAGTTGCGGCCAGG-3'	1°T=47°C	2°T=63°C
Minus 5'-GGATCCTTACTGAACCTTCGAG-3'	1°T=41°C	2°T=61°C

X56040

Plus 5'-CATATGTAACTTGTGGTCAAGTTA-3'	1°T=45°C	2°T=61°C
Minus 5'-GGATCCTTACTGAACCGTGGAG-3'	1°T=43°C	2°T=63°C

AM051295

Plus 5'-CATATGTAACTTGTGGTCAAGTTA-3'	1°T=45°C	2°T=61°C
Minus 5'-GGATCCTTACTGAACTTTAGAACA-3'	1°T=41°C	2°T=61°C

È stata così verificata l'avvenuta amplificazione mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio 0.8%; successivamente la banda d'interesse è stata estratta dal gel, purificata e quantificata.

L'inserto modificato ottenuto è stato inserito nel plasmidio pGEM-T-Easy secondo le modalità precedentemente descritte, e il tutto utilizzato per la trasformazione di cellule di *E.coli* XL1 Blue. Le colonie ricombinanti sono state identificate mediante analisi del pattern di restrizione con EcoRI del DNA plasmidico estratto.

3.3.Clonaggio delle sequenze codificanti per LTP di pomodoro nel vettore di espressione pET-11b

Al fine di ottenere l'inserto corrispondente a ciascuna sequenza codificante per LTP di pomodoro, il DNA plasmidico ottenuto è stato sottoposto a digestione con le endonucleasi NdeI e BamHI. Il frammento di restrizione è stato quindi inserito nel vettore di espressione

pET-11b, secondo protocolli standard. pET è il sistema di espressione utilizzato per la produzione della proteina d'interesse, è un vettore molto efficiente e consente di ottenere un'elevata resa di espressione della proteina eterologa. Il sistema pET è un sistema avanzato per il quale l'espressione è controllata dai promotori forti e inducibili, riconosciuti da RNA-polimerasi fagiche espresse da geni inseriti nel genoma batterico.

Con il prodotto della reazione di ligazione sono state inizialmente trasformate cellule di *E.coli* XL1 Blue; la verifica della presenza dell'inserito è avvenuta attraverso *PCR colony*, utilizzando i primers *pET minus* e *pET plus* complementari a sequenze del vettore pET-11b. L'avvenuta amplificazione è stata invece verificata mediante analisi elettroforetica su gel di agarosio 0.8%; il DNA plasmidico dei cloni risultati positivi è stato sottoposto a sequenziamento presso la BMR-Genomics di Padova, ed utilizzato quindi per trasformare con metodo chimico cellule di *E.coli* BL21 Origami adatte per l'espressione proteica.

4. ESPRESSIONE IN FORMA RICOMBINANTE DI LTP DI POMODORO

4.1. Prova di induzione ed ottimizzazione delle condizioni di espressione

Cellule di *E.coli* BL21 Origami trasformate con ciascun plasmide pet11b-LTP di pomodoro sono state fatte crescere in 100 ml di LB addizionato degli opportuni antibiotici, a 37°C in continua agitazione. Una volta raggiunto un valore di densità ottica opportuno ($OD_{600\text{ nm}}=0.6-0.8$), l'induzione dell'espressione della proteina mediante l'impiego di isopropil-D-tiogalattopiranoside (IPTG) ad una concentrazione finale di 1 mM è stata protratta per 24 ore a differenti temperature quali 25°C, 28°C e 37°C. Successivamente si raccolgono le cellule mediante centrifugazione e si verifica l'avvenuta induzione di LTP mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (15%) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).

Una volta ottimizzata la temperatura e tempi di induzione delle isoforme di LTP di pomodoro, è stata effettuata l'espressione in larga scala, facendo crescere le cellule *E.coli* BL21 Origami in 3 L di terreno LB adottando il protocollo precedentemente riportato.

4.2.Verifica della solubilità di LTP di pomodoro

Dopo aver verificato l'avvenuta induzione, si verifica la solubilità della proteina in uno specifico tampone di estrazione eseguendo, dunque, una prova di lisi cellulare.

Si risospende il precipitato cellulare in 6 ml di tampone di lisi (50 mM di fosfato di sodio pH 8, 0.3 M Cloruro di sodio, Glicerolo 10%, 1 μ M pepstatina, 1 μ M leupeptina, 100 μ M PMSF) per ogni 100 ml di coltura, privo di β -mercaptoetanololo che potrebbe ridurre i ponti disolfuro presenti nella proteina. La sospensione si sottopone a 20 cicli di sonicazione della durata di 30 secondi ciascuno, intervallati da 30 secondi di riposo in ghiaccio. Il lisato cellulare si centrifuga a 7500 rpm per 15 minuti a 4°C. Si risospende il precipitato in un medesimo volume di acqua distillata. Si evidenzia la presenza della proteina nel surnatante mediante SDS-PAGE.

5.PURIFICAZIONE DI LTP DI POMODORO

5.1.Cromatografia a scambio cationico

Il surnatante ottenuto dalla lisi della coltura batterica è stato sottoposto a centrifugazione e ultrafiltrazione in cella Amicon (*cut-off* membrana 3000 Da). Il filtrato è stato scambiato tre volte nella stessa cella con Acetato di Sodio 10 mM pH 5.6 fino ad un volume finale di 4 ml e sottoposto a cromatografia a scambio cationico. Per la separazione cromatografica della proteina ricombinante LTP di pomodoro sono stati utilizzati 12 ml di resina SP-SEPHAROSE fast-flow (Amersham Pharmacia Biotech AB), la cui matrice è costituita da agarosio con gruppi $-\text{SO}_3^-$. Prima di caricare il campione la colonna è stata equilibrata con Sodio Acetato 10 mM pH 5.6. Dopo aver caricato il campione è stata effettuata un'eluizione a gradiente lineare di NaCl da 0 a 0.7 M in tampone Sodio Acetato 10 mM pH 5.6, con flusso di 0.2 ml/min, raccogliendo frazioni con un volume di 2 ml. Il profilo di eluizione si segue determinando l'assorbanza a 260 nm e 280 nm, mediante spettrofotometro UV-VIS Varian Cary 1E. Le frazioni proteiche che mostrano un significativo valore di assorbanza a 280 nm, vengono ulteriormente analizzate mediante SDS-PAGE su gel di acrilamide al 15%.

5.2. Determinazione della concentrazione di LTP di pomodoro

Le frazioni eluite dalla colonna SP-SEPHAROSE, contenenti le proteine ricombinanti purificate, sono state riunite e concentrate in Amicon (*cut-off* membrana 3000 Da). Una volta noto il coefficiente di estinzione molare (ϵ) della proteina, è stata determinata la concentrazione misurando l'assorbanza a 280 nm mediante spettrofotometro UV-VIS Varian Cary 1E con scansione tra 240 nm e 320 nm.

6. CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DI LTP DI POMODORO

6.1. Prove di legame della lisolecitina lyso C₁₆ a LTP di pomodoro

Le proteine ricombinanti purificate sono state dializzate per 24 ore, utilizzando una membrana da dialisi con *cut-off* di 3500 Dalton e come tampone di scambio PBS (Cloruro di sodio 8 g/l, Cloruro di potassio 0,2 g/l, Fosfato di Sodio dibasico 1,44 g/l, Fosfato di potassio monobasico 0,24 g/l). Al fine di verificare che la nsLTP di pomodoro ricombinante fosse funzionalmente attiva, è stata indagata la sua capacità di legare la lisocitina 1-palmitoil-2-lisofosfatidilcolina (lysoC₁₆). L'interazione delle nsLTP con la lysoC₁₆, può essere tipicamente evidenziata seguendo l'aumento della fluorescenza proteica. Tale aumento è dovuto all'incremento dell'emissione di fluorescenza del gruppo fenolico del residuo di tirosina 79 (Y79), un residuo altamente conservato tra le nsLTP. L'interazione tra LTP di pomodoro e lysoC₁₆ è stato evidenziato mediante spettri di emissione della fluorescenza proteica prima e dopo l'aggiunta di 1 equivalente di lyso C₁₆ ($\lambda_{eccitazione}=275$ nm, $\lambda_{emissione}=290-370$ nm, massimo di eccitazione a 275 nm). Le prove sono state condotte usando 100 μ l di tampone Tris-HCl 20 mM pH 7.5, in presenza di LTP di pomodoro ad una concentrazione di 10^{-4} M con aggiunte di massimo 2 equivalenti di lyso C₁₆ solubilizzata in acqua milliQ. È stato così calcolato l'incremento percentuale di fluorescenza associato al legame della lisolecitina.

6.2. Misure di dicroismo circolare

La tecnica del dicroismo circolare (CD) ha assunto una certa importanza per lo studio delle

proteine, in quanto essa è in grado di fornire indicazioni sulla loro struttura secondaria e sul loro stato nativo o denaturato. La misura viene effettuata mediante spettropolarimetro. Il dicroismo circolare può essere un efficace strumento per lo studio dei cambiamenti conformazionali delle proteine. Per esempio, se una proteina viene denaturata in modo tale che la sua struttura nativa venga trasformata in una struttura non ripiegata, ad avvolgimento casuale, questa trasformazione si rifletterà in un sostanziale cambiamento del suo spettro CD. Poiché i legami peptidici assorbono nel lontano UV, lo spettro di dicroismo circolare in tale regione è particolarmente utile per l'analisi della struttura secondaria e di eventuali modificazioni. Nella fattispecie le nsLTP sono proteine che presentano quattro α eliche, il loro spettro è facilmente confrontabile con un modello di riferimento. Lo spettro di una proteina di tipo α presenta due minimi intorno a 222 nm e 208 nm e un massimo molto evidente intorno a 190 nm.

Gli spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (250-200 nm) sono stati registrati utilizzando uno spettropolarimetro Jasco J-715 ed una cuvetta al quarzo con cammino ottico di 1 mm. La misura è stata condotta su un campione da 300 μ l di LTP di pomodoro ricombinante 0.4 mg/ml in Acetato di Sodio pH 4.3 (pH al quale il pomodoro è sottoposto a trattamenti industriali). Sono stati registrati gli spettri con temperature di riscaldamento che vanno da 25°C a 105°C, con incremento graduale di 10°C dopo 5 minuti di termostatazione alla temperatura desiderata. Successivamente si registra lo spettro raffreddando da 105°C direttamente a 25°C.

Sono stati impostati i seguenti parametri:

- Cammino ottico: 1 mm
- Range: $300 < \lambda < 200$ nm
- Scanning speed: 100 nm/min
- Sensibilità: 100 mdeg
- Fenditura: 20 nm
- Numero di accumulazioni : 3
- Response: 1 sec
- Data pitch: 0.5 nm
- Volume cuvetta: 300 μ l.

I dati relativi alla denaturazione termica sono stati ottenuti osservando l'aumento di ellitticità molare alla lunghezza d'onda di 220 nm; le variazioni osservate sono state utilizzate per

calcolare la denaturazione percentuale secondo la seguente formula: Denaturazione % = $(CD_t - CD_{25}) / (CD_{105} - CD_{25}) * 100$, dove CD_t è il valore di ellitticità molare alle differenti temperature, mentre CD_{105} e CD_{25} sono rispettivamente i valori di ellitticità molare registrati a 105°C e 25°C.

7. CARATTERIZZAZIONE DELLE LTP DI POMODORO COME ALLERGENI

7.1. Saggio di ELISA INHIBITION (Metodo ISAC-Immuno Solid-phase Allergen chip)

L'isoforma X56040 di LTP di pomodoro è stata purificata e sottoposta a saggi di ELISA INHIBITION al fine di studiarne la reattività immunologica. L'analisi è stata effettuata in collaborazione con l'Istituto Dermopatico dell'Immacolata IRCCS di Roma adottando il sistema ISAC. In questo caso il metodo è basato sull'immobilizzazione di allergeni, ovvero LTP di diversa origine, su *chip* e successivamente su l'esposizione di quest'ultimi a un pool di sieri di pazienti allergici a LTP di pesca (Pru p 3). Nell'esperimento sono stati utilizzati due *chip* diversi per le inibizioni (*Chip 1* e *Chip 2*), uno di routine ed uno sperimentale con immobilizzate nuove LTP naturali purificate. Inoltre sono stati utilizzati due sieri: un siero caratterizzato corrispondente ad un paziente singolo allergico a Pru p 3, ed un pool di sieri di pazienti allergici anch'essi a LTP di pesca. Infine è stato utilizzato un controllo negativo, nel quale era assente l'inibitore; diversamente nelle prove di inibizione sono stati utilizzate le proteine Lyc e 3 X56040 (Concentrazione 1 mg/ml) e come controllo positivo Pru p 3 naturale purificata dalla pesca (Concentrazione 1 mg/ml). I *chip* sono stati a loro volta lavati per 60 minuti con tampone TBS-T (Cloruro di Sodio 150 mM, Tris base 10 mM, Tween 20 0.5%, pH 8), risciacquati con acqua deionizzata ed essiccati. Successivamente i *chip* sono stati incubati con il pool di sieri precedentemente incubati con LTP di pomodoro impiegato come inibitore per 120 minuti a temperatura ambiente e sottoposti ad una serie di lavaggi con acqua deionizzata e tampone TBS-T. Gli anticorpi così legati agli allergeni immobilizzati sono stati identificati attraverso incubazione con anticorpi anti-IgE umane marcati con il fluoroforo Alexa Fluor 546 (Alexa Fluor 546 protein labeling kit, Molecular probes, Leiden, Netherlands). Allo scopo di rilevare il segnale, i *chip* sono stati sottoposti a scansione per l'acquisizione dell'immagine mediante ScanArray Gx Microarray Analysis System (Perkin Elmer life and Analytical Sciences, Shelton, CT), e quest'ultima analizzata attraverso software

ScanArray Express 3.0 (PerkinElmer).

CONCLUSIONI

Le *plant non specific Lipid Transfer Proteins* costituiscono una famiglia di allergeni ampiamente diffusi nel regno vegetale; sono proteine di trasporto a basso peso molecolare (circa 9 KDa), monomeriche, la cui struttura è caratterizzata da quattro α -eliche collegate da quattro ponti disolfuro (66). Il *plant nsLTPs fold* è peculiare e caratterizzato da una cavità idrofobica in grado di legare una vasta gamma di composti lipidici; è proprio la presenza di una *lipid-binding cavity* a suggerire un ruolo nel traffico di lipidi, e in particolare, considerando la localizzazione extracellulare delle nsLTPs, nella formazione degli strati protettivi esterni della pianta (76). Ad oggi la funzione biologica delle nsLTPs non è stata definita in maniera univoca, sono stati proposti anche vari ruoli nei meccanismi di difesa e nel processo di sviluppo della pianta. Le nsLTPs sono inoltre note per il loro carattere allergenico e negli anni si è creato un largo interesse, sia rispetto al loro potenziale allergenico che al ruolo biologico non ancora chiarito; le nsLTPs sono state individuate in numerosi alimenti vegetali e sono le principali proteine allergeniche in grado di causare reazioni IgE-mediate nell'area mediterranea (84). Tali proteine sono state definite *true food allergens* in quanto responsabili della sensibilizzazione primaria associata alla formazione di immunoglobuline IgE specifiche e dell'induzione di sintomi sistemici. Queste caratteristiche sono state correlate all'elevata stabilità termica delle nsLTPs ed alla loro resistenza alla proteolisi ed ai cambiamenti drastici di pH (99,100); negli anni tale aspetto ha suscitato l'interesse degli studiosi poiché le nsLTPs, a differenza di altre proteine allergeniche, sono in grado di conservare la loro reattività immunologica anche a seguito di drastici processi industriali (85). I casi più noti di reazioni avverse alle nsLTPs sono allergie ai frutti appartenenti alle *Rosaceae* (pesca, mela, albicocca, ecc.); ad oggi sono state identificate varie nsLTPs di *Rosaceae* quali per esempio Pru p 3, Mal d 3, Pru ar 3, localizzate principalmente negli strati epidermici più esterni degli organi vegetali, spiegando con ciò la forte allergenicità della buccia dei frutti a confronto con la polpa (70). La LTP di pesca (Pru p 3) è stato il primo membro delle nsLTPs ad essere riconosciuto come allergene delle *Rosaceae*, essa rappresenta infatti la proteina di riferimento o "prototipo" per l'intera famiglia. L'elevato grado di conservazione delle caratteristiche strutturali e di sequenza delle nsLTPs fanno sì che queste proteine siano note come panallergeni, determinando reazioni crociate con altre nsLTPs appartenenti a specie botaniche non correlate (73).

Fra gli alimenti di origine vegetale con un alto potenziale allergenico, il pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) è uno dei maggiori componenti della dieta della popolazione mondiale, ampiamente coltivato e diffuso in particolare nell'area Mediterranea (110). Precedenti studi hanno dimostrato che anche nel pomodoro è presente una proteina allergenica riconducibile a nsLTP e denominata Lyc e 3 (LTP di pomodoro), di peso molecolare di circa 8-10 kDa e con un ipotetico modello strutturale analogo a quello delle altre nsLTPs vegetali. Ad oggi sono note varie isoforme di LTP di pomodoro e le loro sequenze nucleotidiche risultano depositate nelle banche dati. Al fine di verificare la presenza di Lyc e 3 in differenti *cultivar* di pomodoro e la sua distribuzione tissutale, abbiamo selezionato le varietà Piccadilly, Marinda, Lancelot e San Marzano ed estratto l'RNA dai vari tessuti ai fini dell'analisi Northern blotting. I risultati dell'analisi hanno evidenziato in tutte le *cultivar* di pomodoro analizzate la presenza di Lyc e 3 nella buccia e l'assenza di specifici trascritti rilevabili con questa tecnica corrispondenti ad LTP di pomodoro in polpa e semi (Figura 15). Questo dato è in accordo con precedenti lavori effettuati su differenti tessuti di pesca e con studi clinici che hanno dimostrato una minor allergicità di polpa rispetto a buccia di *Rosaceae* (82,17). Era inoltre nostro interesse individuare la specificità di distribuzione delle singole isoforme di LTP di pomodoro, mediante analisi Northern blotting con sonde specifiche progettate per riconoscere le singole isoforme. Ove non disponibile in banca dati abbiamo ottenuto mediante 3'-RACE la sequenza completa del gene corrispondente a LTP di pomodoro (Figura 18), necessaria per la progettazione di sonde specifiche in grado di discriminare fra le singole isoforme; al momento è in corso la realizzazione delle suddette sonde ai fini dell'analisi Northern blotting.

Una volta definita la distribuzione di LTP di pomodoro nei vari tessuti, abbiamo voluto identificare le isoforme di LTP di pomodoro e definirne l'abbondanza relativa nella buccia, tessuto in cui sono risultate maggiormente presenti. Partendo quindi dai cDNA ottenuti per retrotrascrizione dell'mRNA di buccia estratto dalle varietà di pomodoro analizzate, si è proceduto al clonaggio e sequenziamento di un campione costituito da 10 cloni rappresentativi. Il confronto delle sequenze ottenute con le sequenze depositate in banca dati ha confermato complessivamente la presenza delle quattro isoforme note in banca dati con il codice: AK224707, X56040, AM051296 e AM051295; in particolare le isoforme più abbondanti in tutte le varietà di pomodoro analizzate sono risultate essere AK224707, X56040, AM051295 (Figura 19). Una volta rese note le proprietà biochimiche ed allergeniche delle singole

isoforme sarà eventualmente possibile stabilire una correlazione fra la loro espressione *in planta* e fattori quali il grado di maturazione, varietà botanica, ecc.

In numerosi studi varie *plant LTPs* risultano prodotte in forma ricombinante; ad oggi LTP di pomodoro non è mai stata estratta da fonte naturale nè prodotta in forma ricombinante. Il nostro studio si è quindi focalizzato sul clonaggio ed espressione in forma ricombinante delle proteine corrispondenti alle isoforme da noi identificate, al fine di procedere con la caratterizzazione biochimica ed immunologica. Nel nostro studio abbiamo amplificato e successivamente clonato nel vettore di espressione pET-11b le quattro isoforme di LTP di pomodoro, i plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati quindi utilizzati per la trasformazione di cellule di *E.coli* idonee per l'espressione. Sono state effettuate prove di induzione di LTP di pomodoro, evidenziando un *optimum* ad una temperatura di 28°C per 24 ore in presenza di IPTG 1 mM; l'analisi SDS-PAGE ha evidenziato l'avvenuta induzione delle isoforme di LTP di pomodoro e la loro presenza nella frazione solubile a seguito di lisi cellulare (Figura 23, 33, 35). Successivamente le proteine così ottenute sono state purificate utilizzando una cromatografia a scambio cationico (Figura 24, 34, 36). In questa fase si è deciso di proseguire con l'analisi biochimica dell'isoforma X56040 da noi purificata, di cui era stata preventivamente verificata la massa mediante analisi ESI-MS; l'isoforma di LTP di pomodoro analizzata ha evidenziato proprietà funzionali analoghe a quelle di altre nsLTPs. In primo luogo ha mostrato una buona capacità di legare la lisolecitina 1-palmitoil-2-lisofosfatidilcolina (LisoC₁₆); studi di legame hanno infatti evidenziato un aumento di fluorescenza a seguito dell'interazione del composto lipidico con LTP di pomodoro (Figura 26), questo dato risulta coerente con i dati ottenuti impiegando come controllo Pru p 3 e con quanto dimostrato in precedenza per le nsLTP di frumento e mais, estratte dalle fonti naturali o espresse in forma ricombinante.

La struttura secondaria di X56040 è stata analizzata mediante misure di dicroismo circolare che, a temperatura ambiente sia a pH acido che neutro, hanno evidenziato uno spettro nel lontano UV analogo a quello delle altre nsLTPs (Figura 28, 29). Inoltre al fine di valutare la stabilità termica della proteina in esame, gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati in funzione della temperatura; il riscaldamento fino a 105°C a pH neutro determina una denaturazione irreversibile della proteina, diversamente a pH acido la proteina è in grado di riacquistare il *fold* originario (Figura 26, 27). Nonostante questi dati di stabilità al calore si riferiscano alla proteina in forma pura, riteniamo di poter estendere il comportamento

osservato alla proteina presente in alimenti, pensiamo quindi che l'isoforma X56040 di LTP di pomodoro sia un allergene potenzialmente attivo ed in grado di scatenare una risposta allergica anche a seguito di trattamenti termici di cottura ed in presenza di pH acido (ad esempio a seguito di trattamenti di pastorizzazione della passata di pomodoro).

Infine l'isoforma X56040 prodotta in forma ricombinante è stata caratterizzata dal punto di vista immunologico; la sua reattività immunologica è stata studiata mediante saggi di *ELISA inhibition* con sistema ISAC (*Immuno Solid-phase Allergen chip*) utilizzando un *pool* di sieri di pazienti allergici a Pru p 3. I risultati ottenuti hanno evidenziato un'inibizione superiore al 50% verso LTP di artemisia, nocciola e pesca e valori inferiori per le altre specie botaniche considerate (Figura 32). Il confronto di questi dati con quelli ottenuti impiegando LTP di pesca come inibitore indicano una parziale sovrapposizione degli epitopi riconosciuti dalle IgE localizzati su LTP di pesca e pomodoro. Al momento si sta procedendo con la caratterizzazione biochimica ed immunologica delle altre isoforme di LTP di pomodoro.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Rona RJ et al. The prevalence of food allergy: a metanalysis. *J Allergy Clin. Immunol.* 2007. 120 (3): 638-646
- (2) Wood RA. The natural history of food allerg. *Pediatrics* 2003. 111:1631-7
- (3) May C.D. Immunologic versus toxic adverse reactions to foodstuffs. *Ann Allergy* 1983. 55: 267-268
- (4) Cappeli P, Vannucchi V. *Chimica degli alimenti*. Zanichelli editore 2005
- (5) Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on allergic patient. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 2010. 6:1
- (6) Ballmer-Weber BK, Vieths S. Soy allergy in perspective. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008. 8: 270-275
- (7) Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Becker WM, Koppelman SJ, Knulst AC, Helbling A, Hefle SL, Van Ree R, Vieths S. Ara h 8 a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114: 1410-1417
- (8) Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, Hill D, Oranje AP, Brueton M, Staiano, Dupont C. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007. 92: 902-908
- (9) Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensivities. *Allergy Clin Immunol* 2005. 115: 3-12
- (10) Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, et al. Allergy Diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100: S1-148
- (11) Gerez I F A, Shek L P C, Chng H H, Lee B W. Diagnostic tests for food allergy 2010. 51(1): 4-9
- (12) Sicherer SH, Teuber S. Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 2004. 114:1146-50
- (13) Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 2010. 126: 1-58
- (14) Akiyama H, Imai T, Ebisawa M, Mukoyama T, Morikawa A, Kondo N. Japanese Guideline for food allergy. *Allergol Int* 2011. 62:139-71

- (15) Youngshin H, Jihyun Kim, Kangmo A. Food Allergy. Korean J Pediatr 2012. 55(5): 153-158
- (16) Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, et al. Prevalence of sensitization to Artemisia allergens Art v 1, Art v3 and Art v 60 Kda. Cross-reactivity among Art v3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. Clin. Exp. Allergy 2004. 34: 1415-1421
- (17) Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. J Allergy Clin Immunol 2003. 112:789-795
- (18) Scheurer S, Son DY, Boehm M, Karamloo F, et al. Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. Mol immunol 1999. 36: 155-167
- (19) Chapman MD, Pomes A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol 2007. 199: 414-420
- (20) de Groot J, Kosters HA, de Jongh HH. Deglycosylation of ovalbumin prohibits formation of a heat-stable conformer. Biotechnol Bioeng 2007. 97: 735-741
- (21) Farouk S, Amir M.G., Herb F.S. The molecular basis of allergenicity. Trends in immunology 2008. 29 (12)
- (22) Traidl-Hoffmann C, Jakob T, Behrendt H. Determinants of allergenicity. The Journal of Allergy and Clinical Immunol 2009. 123(3):558-566
- (23) Chakravarty S, Varadarajan R. Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. FEBS Lett 2000. 509: 27-30
- (24) Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J et al. Lipid transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. J allergy Clin Immunol 2003. 112: 775-83
- (25) Hilmenyuk T, Bellinghausen I, Heydenreich B, Ilchmann A, Toda M et al. Effects of glycation of the model food allergen ovalbumin on antigen uptake and presentation by human dendritic cells. Immunology 2010. 129: 437-445
- (26) Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R et al. Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: role of macrophage scavenger receptor class A type I e II. J Allergy Clin Immunol 2010. 175-183
- (27) Fötisch K, Altmann F, Haustein D, Vieths S. Involvement of carbohydrate epitopes in

- the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999. 120:30–42.
- (28) Fötisch K, Westphal S, Lauer I, Retzek M, Altmann F, et al. Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2003. 111:889–896.
- (29) Fötisch K, Son DY, Altmann F, Aulepp H, Conti A, et al. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients. *Eur Food Res Technol*. 2001. 213:259–266.
- (30) Kondo Y, Urisu A, Tokuda R. Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 2001. 126:294–299.
- (31) Breiteneder H, Mills Clare EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005. 15(1)
- (32) Vissers YM, Blanc F, Skov PS et al. Effect of heating and glycation on the allergenicity of 2S Albumins (Ara h 2/6) from Peanut. *Plos One* 2011. 6(8)
- (33) Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hofmann T. Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J Agric Food Chem* 2004. 52:4002-4007
- (34) Nakamura A, Sasaki F, Watanabe K, Ojima T, Ahn DH et al. Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *J Agric Food Chem* 2006. 54: 9529-9534
- (35) Gruber P, Becker WM, Hofmann T. Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *J Agric Food Chem* 2005. 53: 2289-2296
- (36) Lopez E, Cuadrado C, Burbano C, Jimenes MA, Rodriguez J, Crespo JF. Effects of autoclaving and high pressure on allergenicity of hazelnut proteins. *Journal of Clinical Bioinformatics* 2012. 2(12)
- (37) Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2010. 6(1)
- (38) Cornelisse-Vermaat JR, Voordouw J, Chryssochoidis G, Theodoridis G, Woestman L, Frewer LJ. The information needs and labelling preferences of food allergic consumers: the view of stakeholders regarding information scenarios. *Trends in food science and technology* 2008. 19:669-676
- (39) Jerne NK. Immunological speculations. *Ann Rev Microbiol* 1960. 14:341–358
- (40) Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, Burks AW, Bannon GA. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J Immunol*. 2000. 164:5844–5849

- (41) Schimek EM, Zwolfer B, Briza P, Jahn-Schmid B, Vogel L, Vieths S, Ebner C, Bohle B. Gastrointestinal digestion of Bet v 1-homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity. *J Allergy Clin Immunol* 2005. 116:1327-1333
- (42) Pomes A. Relevant B Cell Epitopes in Allergic Disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2010. 152(1):1-11
- (43) Cramer R. Correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *Biochem J* 2003. 376, e1-e2.
- (44) Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I, Vrtala S. From allergen genes to allergy vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010. 28:211-241
- (45) Wallner M, Gruber P, Radauer C, Maderegger B, Susani M, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F. Lab scale and medium scale production of recombinant allergens in *Escherichia coli*. *Methods* 2004. 32(3): 219-226
- (46) Siegert M, Pertl-Obermeyer H, Gadermaier G, Ferreira F, Obermeyer G. Expression of the major mugwort pollen allergen Art v 1 in tobacco plants and cell cultures: problems and perspectives for allergen production in plants. *Plant Cell Rep* 2012.31(3): 561-571
- (47) Doran PM. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 2000.11(2):199-204.
- (48) Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. *Current opinion in Immunology* 1995. 7:751-756
- (49) Ott H, Schroder C, Raulf-Heimsoth M, Mahler V, Ocklenburg C, Merk HF, Baron JM. Microarrays of recombinant Hevea Brasiliensis Proteins: a novel tool for the Component-Resolved Diagnosis of Natural Rubber Latex allergy. 2010. *J Investig Allergol Clin immunol*. 20(2): 129-138
- (50) Pumphrey RS. Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions. *Clin exp allergy* 2000. 30: 1144-50
- (51) Fernandez-Rivas M, Benito C, Gonzalez-Manceo E, Alonso Diaz de Durana MD. Allergies to fruits and vegetables. *Pediatr Allergy Immunol* 2008. 19: 675-681
- (52) Marcus J.P., Green J.L., Goulter K.C., Manners J.M. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J* 1999. 19:699-710
- (53) Guo F, Kothary MH, Wang Y, Yu X, Howard AJ, Fu TJ, Zhang YZ. Purification and crystallization of Cor a 9, a major hazelnut allergen. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol*

Cryst Commun 2009. 65(Pt 1):42-6

(54) Candido Ede S, Pinto MF, Pelegrini PB, Lima TB, Silva ON, Pogue R, Grossi de Sà MF, Franco OL. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanism. FASEB J 2011. 25(10):3290-305

(55) Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. J Allergy Clin Immunol 2004. 113(5)

(56) Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-De-sa MF, Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. Eur J Biochem 2002. 269:397-412

(57) Nakase M, Adachi T, Urisu A, Miyashita T, Alvarez AM, Nagasaka S et al. Rice (*Oryza sativa* L.) alpha amylase inhibitors of 14-16 KDa are potential allergens and products of a multi gene family. J Agric Food Chem 1996. 44: 2624-8

(58) Muntz K. Deposition of storage proteins. Plant Mol Biol 1998. 38: 77-99

(59) Maruyama N, Ichise K, Katsube T, Kishimoto T, Kawase S, Matsumura T et al. Identification of major wheat allergens by means of the *Escherichia coli* expression system. Eur J Biochem 1998. 255:739-45

(60) Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H et al. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. J Allergy Clin Immunol 2001. 108:634-8

(61) Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardoso MJ. Latex B-serum β -1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the micro helix (Hev b 4) are major latex allergen. J Nat Rubb Res 1998. 10: 82-99

(62) Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, Peterbauer C, Campillo N, Witty M et al. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. J Mol Biol 2003. 329:721-30

(63) Moroz LA, Yang WH. Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. N Engl J Med 1980. 302: 1126-8

(64) Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, farioli L, Rivolta F, Ansaloni R et al. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruits. J Allergy Clin Immunol 1998. 101:531-7

(65) Sankian M, Talebi F, Moghadam M, Vahedi F, Azad FJ, Varasteh AR. Molecular cloning and expression of Cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like protease of Cucumis

- melo in *Escherichia coli*. *Allergol Int* 2011. 60(1):61-7
- (66) Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. 2007. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771:781-791
- (67)-Kuppanan K, Albers DR, Schafer BW, Dielman D, Young S. Quantification and characterization of maize lipid transfer protein, a food allergen, by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Anal Chem.* 2011. 83:516-524
- (68) Lombardo C, Regente M, Pinedo M, Martin M, De la Canal L. Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *Journal of Plant physiology* 2008. 166(8):797-806
- (69) Bernardi ML et al. Allergenic Lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwi fruit LTP as a model. *PloS One* 2011. 6(11):e27856
- (70) Cavatorta et al. Unambiguous characterization and tissue localization of Pru p 3 peach allergen by electrospray mass spectrometry and MALDI imaging. *J Mass Spectrom* 2009. 44(6):891-897
- (71) Kader JC. Lipid-transfer proteins in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant mol Biol.* 1996. 47:627-654
- (72) Sy D, Le Gravier Y, Goodfellow J, Vovelle F. Protein stability and plasticity of the hydrophobic cavity in wheat ns-LTP. *J Biomol Struct Dyn* 2003. 21:15-29
- (73) Pasquato N, Berni R, Folli C, Folloni S, Cianci M, Pantano S, Helliwell JR, Zanotti G. Crystal structure of Peach Pru p 3, the prototypic member of the family of the plant non Specific Lipid Transfer Protein Pan-allergens. *J Mol Biol* 2006. 356:684-694
- (74) Da silva P, Landon C, Beltoise R, Ponchet M, Vovelle F. Accessibility of tobacco Lipid Transfer Protein cavity revealed by ¹⁵ N NMR relaxation studies and molecular dynamics simulations. *Proteins* 2006. 64:124-132
- (75) Tassin-Moindrot S, Caille A, Douliez JP, Marion D, Vovelle F. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. *FEBS Journal* 2001. 267(4):117-1124
- (76) Douliez JP, Michon T, Elmorjani K, Marion D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J Cereal Sci* 2000. 32:1-20

- (77) Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta*. 2007. 1771:781-791
- (78) Torres-Schuman S, Godoy JA, Pintor-Toro JA. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Molecular Biology* 1992. 18: 749-757
- (79) Jung HW, Kim W, Hwang BK. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic and environmental stresses. *Plant Cell Environ*. 2003. 26:915-928
- (80) Wang SY, Wu JH, Ng TB, Ye XY, Rao PF. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides* 2004 25:1235-1242
- (81) Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You KH. Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plan Mol Biol* 2002 48:243-254
- (82) Brenna OV, Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Pompei C. Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. *J Agric Food Chem* 2004. 52:7997-8000
- (83) Tomassen MM, Barret DM, Van der Valk HCPM, Woltering EJ. Isolation and characterization of a tomato non-specific lipid transfer protein involved in polygalacturonase-mediated pectin degradation. *J Exp Botany* 2006. 58:1151-1160
- (84) Asero R, Antonicelli L, Arena A, Bommarito L, Caruso B, Crivellaro M, De Carli M, Della Torre F, Heffler E, Lodi Rizzini F, Longo R, Manzotti G, Marcotulli M, Melchiorre A, Minale P, Morandi P, Moreni B, Moschella A, Murzilli F, Nebiolo F, Poppa M, Randazzo S, Rossi G, Senna GE. EpidemAAITO: features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multicentre study. *Clin Exp Allergy* 2009. 39:547-55
- (85) Egger M et al. The role of Lipid Transfer Proteins in allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010. 10(5):326-335
- (86) Sancho AI et al. The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy* 2005. 60(10):1262-1268
- (87) Asero L et al. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000. 122(1):20-32
- (88) Wijesinha-Bettoni R et al. The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis. *Biochemistry* 2010.

49(10):2130-9

(89) Zuidmeer L, van Ree R. Lipid Transfer Protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007. 7(3):269-273

(90) Pasquato N et al. Crystal structure of Peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non specific lipid transfer protein pan-allergen. *J Mol Biol* 2007. 356(3):684-694

(91) Borges JP et al. Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008. 365(4):685-690

(92) Ramazzina I, Amato S, Passera E, Sforza S, Mistrello G, Berni R, Folli C. Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3). *Gene* 2012. 491:173-181

(93) Garcia-Olmedo F et al. The defensive role of non specific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* 1995. 3(2):72-74

(94) Arena A. Anaphylaxis to apple: is fasting a risk factor for LTP-allergic patients? *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2010. 42(4):155-158

(95) Asero R, Mistrello G, Amato S. Anaphylaxis caused by tomato lipid transfer protein. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2011. 42(4):125-126

(96) Yagami A. Anaphylaxis to lipid transfer protein from sunflower seeds. *Allergy* 2010. 65(10):1340-1341

(97) Palacin A et al. Anaphylaxis to wheat flour-derived food-stuffs and the lipid transfer protein syndrome: a potential role of wheat lipid transfer protein Tri a 14. *Int Arch Allergy Immunol* 2010. 152(2):178-183

(98) Hansen KS et al. Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *J Allergy Clin Immunol* 2009. 123(5):1134-1141

(99) Duffort OA, Polo F, Lombardero M, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, Salcedo G, Barber D. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *J Agric Food Chem* 2002. 50:7738-7741

(100) Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L et al. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem* 200. 48:493-497

- (101) Garcia-Casado G, Pacios LF, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Barber D, Salcedo G. Identification of IgE epitope of the major peach allergen Pru p 3 2003. 112:599-605
- (102) Borges JP, Barre A, Culerrier R, Granier C, Didier A, Rougè P. Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity 2008. 365:685-690
- (103) Barre A, Borges JP, Rougè P. Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochimie* 2005. 87(6):499-506
- (104) Bonure A, Amoroso S, Locorotondo G, Di Felice G, Tinghino R, Geraci D, Colombo P. Hypoallergenic variants of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1: a member of the non-specific lipid transfer protein plant family. *Int Arch allergy immunol* 2001. 126:32-40
- (105) Scout Angle J. Commercial Tomato Production Handbook. GA. University of Georgia 2006.
- (106) Nasi F, Lazzarotto R, Ghisi R. 1994. *Coltivazioni erbacee*. Liviana editore
- (107) Niclis C, Díaz Mdel P, Eynard AR, Román MD, La Vecchia C. Dietary habits and prostate cancer prevention: a review of observational studies by focusing on South America. *Nutr Cancer* 2012. 64(1):23-33
- (108) Paran I, Knaap van der E. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J Exp Bot* 2007. 58(14):3841-3852
- (109) Pravettoni V, Primavesi L, Farioli L, Brenna OV, Pompei C, Conti A, Scibilia J, Piantanida M, Mascheri A, Pastorello EA. Tomato allergy: Detection of IgE-binding Lipid Transfer proteins in Tomato derivatives and in fresh tomato peel, pulp and seeds. *J Agric Food Chem* 2009. 57:10749-10754
- (110) Dolle S, Schwarz D, Lehmann K, Weckwerth W, George E, Worm M, Franken P. Tomato allergy: impact of genotype and environmental factors on the biological response. *J Sci Food Agric* 2010. 91:2234-2240
- (111) Westphal S, Kempf W, Foetisch K, Retzek M, Vieths S, Scheurer S. Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Allergy* 2004. 59:526-532
- (112) Yelle S, Chetelat R, Dorais M, DeVerna JW, And Bennet A.B. Sink metabolism in tomato fruit. *Plant Physiol* 1999. 95:1026-1035
- (113) Kondo Y, Urisu A, Tokuda R. Identification and characterization of the allergens in

the tomato fruit by immunoblotting. *International Archives of Allergy and Immunology* 2001. 126:294-299

(114)- Lopez-Matas MA, Ferrer A, Larramendi CH, Huertas AJ, Pagan JA, Garcia-Abujeta JL. In vitro cross-reactivity between tomato and other plant allergens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunol* 2009. 103:425-431

(115) Lopez-Matas MA, Ferrer A, Larramendi CH, Huertas AJ, Pagan JA, Garcia-Abujeta JL, Bartra J, Andreu C, Lavin JR, Carnes J. Acid ribosomal protein 60S: A new tomato allergen. *Food Chemistry* 2011. 127:638-640

(116) Lorenz Y, Enrique E, Le Quynh. Skin prick test reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *J Allergy Clin Immunol* 2006. 118(3):711-8

(117) Le Quynh L, Lorenz Y, Scheurer S, Fötisch K, Enrique E, Bartra J, et al. Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotech* 2006. 4:231-242

