

LA POLLINOSI DA CIPRESSO

CUPRESSACEAE



ALLERGENI DELLE CUPRESSACEAE E GENERI CORRELATI

Quella delle Cupressacee (Cipresso) è la famiglia più ampiamente distribuita fra tutte le Gimnosperme, trovandosi, in habitat diversi, in tutti i continenti tranne l'Antartico; la maggior parte dei diversi generi si trova nell'emisfero meridionale, ma quello più rappresentato, lo *Juniperus*, così come il *Cupressus* sono tipici delle aree temperate del Nord. Il *Cupressus* in particolare è molto diffuso nelle regioni che si affacciano sul bacino Mediterraneo. Per questo motivo il polline delle Cupressacee è una causa importante d'allergia respiratoria in molte aree geografiche quali gli Stati Uniti, l'Australia, il Giappone e, in Europa, l'Italia, la Francia e la Spagna. In queste zone infatti l'allergia al cipresso ha assunto negli ultimi anni un'importanza sempre maggiore, conseguente

all'aumentato utilizzo di queste piante sia per uso ornamentale sia di rimboschimento. In Italia l'incidenza della patologia allergica al cipresso ha seguito negli ultimi 10 anni un trend positivo passando in alcune zone da meno del 10% al 30% (19, 20, 21), parallelamente ad un significativo aumento della presenza di granuli pollinici nell'aria durante il periodo di pollinazione (15).

Molti sforzi sono stati compiuti negli ultimi anni per comprendere meglio i fenomeni di cross-reattività fra specie appartenenti alla famiglia delle Cupressacee e fra quest'ultima e la famiglia delle Taxodiacee, di cui il membro sicuramente più importante dal punto di vista allergologico è la *Cryptomeria japonica*. Già nella prima metà del secolo scorso erano state evidenziate cross-reattività fra *Juniperus ashei* (cedro di montagna) e *Chamaecyparis lawsonia* (1). In seguito Panzani e collaboratori (26) dimostrarono una similarità antigenica fra il *Cupressus sempervirens* (noto anche come cipresso comune o cipresso italiano), e la *Cryptomeria japonica* (cedro giapponese). Dopo questo importante lavoro, che per primo evidenziava la similitudine fra proteine di pollini provenienti da specie geograficamente molto distanti, diversi altri ne sono seguiti, fra cui, è lo studio di Schwietz (27) che ha analizzato i fenomeni di cross-reattività fra 12 specie di Cupressaceae (diverse specie di *Cupressus* e di *Juniperus*) una Taxodiacea (*Cryptomeria japonica*), e una pinacea (*Cedrus deodora*). Mediante skin prick test (SPT), immunoblotting e inibizione dell'immunoblotting gli autori hanno dimostrato che tutte le specie tranne quella di *Cedrus deodora* sono estremamente cross-reattive e che in tutte le Cupressacee è presente un allergene maggiore del peso di 40-42 kD corrispondente all'allergene maggiore della *Cryptomeria japonica* a 43-46 kD. Numerosi altri studi confermano queste evidenze (28-35).

La caratterizzazione degli allergeni del polline di Cipresso, così come per tutte le altre Cupressacee, ha creato sempre grandi difficoltà a causa del fatto che essi sono particolarmente ricchi in carboidrati di tipo polimerico, componenti prive di una significativa attività allergenica (36) a scapito delle proteine estraibili in ambiente acquoso a cui è riconducibile la suddetta attività allergenica. L'impiego di qualche accorgimento tecnico ha consentito di eliminare, seppur parzialmente, parte di questi carboidrati, rendendo quindi più semplice la caratterizzazione delle componenti allergeniche presenti in estratti di Cupressaceae. Questo fatto ha in aggiunta contribuito a migliorare notevolmente lo standard qualitativo degli estratti da impiegare per la diagnosi e la terapia dei pazienti affetti da allergia al polline di Cupressaceae (21).

In uno dei primi studi di caratterizzazione dell'estratto di polline di *Cupressus sempervirens* (36) mediante tecniche di elettroforesi e immunoblotting, è stata evidenziata la presenza di numerose componenti ad attività IgE binding, con pesi molecolari da 14 a 96 kD. La maggior parte di queste componenti (allergeni) erano però riconosciuti da una frazione inferiore al 10% dei pazienti testati mentre una componente di circa 42 kD reagiva con oltre l'80% dei sieri legando la maggior parte delle IgE presenti. Inoltre circa il 50% dei pazienti riconosceva esclusivamente questo allergene, dimostrando quindi la sua notevole rilevanza clinica e giustificando ampiamente per lo stesso il termine di allergene maggiore del polline di *Cupressus sempervirens*.

Numerosi studi sono stati parallelamente compiuti da ricercatori giapponesi sul polline di *Cryptomeria japonica* che in Giappone è la causa più frequente di sensibilizzazione allergica nella popolazione.

Già nel 1983 il gruppo di Yasueda (37) aveva purificato, mediante tecniche di cromatografia, l'allergene maggiore del polline di *Cryptomeria japonica* (noto ora come Cry j1) ed aveva evidenziato che si trattava di un gruppo di glicoproteine termolabili con un peso molecolare compreso fra 41-46 kD e un punto isoelettrico di 8.9-9.2. In seguito il gruppo di Taniai (38) aveva ulteriormente purificato queste isoforme determinandone la comune sequenza N-terminale; le variazioni di peso molecolare erano state imputate dal gruppo a forme con diversi gradi di glicosilazione. L'analisi della sequenza di frammenti della proteina purificata hanno evidenziato un'omologia significativa fra un peptide di Cry j1 ed alcuni enzimi ad attività peptidato-lasica, attività riscontrata mediante test di attività enzimatica anche nel Cry j1 stesso. Un secondo allergene rilevante del polline di *Cryptomeria j.* fu isolato nel 1990 dal gruppo di Sakaguchi che lo denominò Cry j2 (39). Tale allergene, del peso molecolare di 37 kD ed un punto isoelettrico oltre 9.5, veniva

infatti riconosciuto dalle IgE sieriche di 10 pazienti sui 14 analizzati, due dei quali negativi sul Cry j1. L'analisi della sequenza N-terminale e la mancanza di reattività con anticorpi monoclonali diretti verso il Cry j1 dimostrava chiaramente che si trattava di un diverso allergene. Alcuni anni dopo fu attribuita a questa proteina un'attività enzimatica poligalatturonasica. Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che i due allergeni maggiori, Cry j1 e Cry j2 sono situati in posizione diversa; mentre l'allergene Cry j1, che è prodotto solo nella fase di maturazione pollinica, si trova localizzato sull'esina del granulo pollinico, l'allergene Cry j2 si trova contenuto nel citoplasma (40). Un'osservazione interessante è stata fatta da un altro gruppo giapponese (41) secondo cui esisterebbero due tipi di specie di *Cryptomeria japonica*: la più diffusa è quella diploide, ma esiste anche una specie triploide e questa sarebbe caratterizzata da concentrazioni più basse d'entrambi gli allergeni e produrrebbe quindi un polline potenzialmente meno allergenico.



L'esistenza di una cross-reattività fra allergeni del *Cupressus sempervirens* e della *Cryptomeria japonica* fu inequivocabilmente dimostrata dal giapponese Taniai (42), il quale, utilizzando sieri di pazienti (di provenienza europea) allergici al polline di cipresso, osservò che tali sieri contenevano IgE in grado di cross-reagire anche contro gli allergeni Cry j1 e Cry j2; inoltre alcuni di questi reagivano verso un peptide derivato dalla digestione enzimatica del Cry j1 che risultava essere glicosilato. L'eliminazione della componente glicidica da questo peptide, mediante trattamento enzimatico, portava alla perdita di reattività con le IgE, dimostrando che le componenti glicidiche delle glicoproteine potevano avere un ruolo importante nel riconoscimento da parte di anticorpi IgE e nei meccanismi della cross-reattività. Studi successivi sulla composizione di queste strutture glicidiche hanno evidenziato che si tratta di composti frequentemente presenti sulle glicoproteine di origine vegetale, e la loro presenza sembra molto importante nello stabilizzare la struttura degli epitopi conformazionali cui sono legati, favorendo così la corretta interazione fra epitopo ed IgE (43). L'importanza della componente glicidica di glicoproteine allergeniche come fattore di cross-reattività è stata anche dimostrata, in anni relativamente recenti, dal nostro gruppo di ricerca, congiuntamente a quello dell'Istituto Superiore di Sanità (44). Mediante l'uso di un anticorpo monoclonale specifico per un epitopo carboidratico dell'estratto di polline di *Cupressus arizonica*, si è dimostrato che tale struttura era presente in un grande numero di estratti di pollini

appartenenti a famiglie tassonomiche correlate e non. La maggiore reattività del monoclonale era ovviamente nei confronti d'estratti di polline di Cupressacee e Taxodiacee, anche se una minore reattività era rilevabile anche nei confronti di alcune specie polliniche appartenenti a famiglie non correlate, quali Fagaceae e Crucifere. Queste strutture glicidiche capaci di legare le IgE di pazienti allergici sono state evidenziate in molte situazioni e sono state chiamate CCD (cross-reacting carbohydrate epitopes). Esse sono risultate essere presenti non solo in allergeni derivanti da varie piante o alimenti vegetali ma anche in allergeni derivanti da funghi insetti e mammiferi e potrebbero essere responsabili della presenza nel siero di IgE specifiche per allergeni clinicamente non rilevanti (45, 46). In questi ultimi anni l'isolamento e la caratterizzazione di diversi altri allergeni di Cupressacee hanno confermato la stretta correlazione esistente fra allergeni maggiori di specie e famiglie diverse. Fra questi, l'allergene maggiore di polline di *Juniperus ashei* è risultato essere una glicoproteina di circa 43 kD, riconosciuta da un anticorpo monoclonale diretto verso l'allergene maggiore di polline di *Criptomeria japonica*, e con un'altissima omologia nella sequenza N terminale con il Cri j1 e il Cha o1 (*Chamaeciparus obtusa*) (47). Sulla base di queste osservazioni l'allergene è stato denominato Jun a 1. Abbastanza sorprendente, anche se già osservata da altri autori, è l'omologia significativa (57 e 53%, rispettivamente) fra la sequenza aminoacidica di Jun a1 e quella di due allergeni del polline di Ambrosia, Amb a1 e Amb a2. Questi allergeni, pur appartenendo ad una famiglia, quella delle Composite, estremamente distante dal punto di vista della sistematica, sono probabilmente simili al gruppo 1 delle Cupressacee dal punto di vista funzionale, avendo anch'esse un sito enzimatico di tipo pectato liase (48). Lo Jun a3, descritto successivamente dallo stesso autore (49) appartiene invece al gruppo 5 della complessa famiglia delle pathogenesis-related protein (PR-5) che sono espresse in grandi quantità quando le piante sono sottoposte a condizioni di stress o infettate da patogeni. L'autore ha infatti riscontrato una differente espressione dell'allergene in pollini raccolti in zone geografiche e anni differenti (49, 50).



Diversi gruppi di ricercatori hanno recentemente messo a punto procedure per isolare il Cup a1 (35,51, 52) ed in particolare il gruppo di Alisi ha dimostrato che l'allergene ha caratteristiche chimico-fisiche simili e un'alta omologia di sequenza aminoacidica con il gruppo 1 di Cupressacee e Taxodiacee. Inoltre ne ha caratterizzato la componente glicidica mediante spettrometria di massa evidenziando che si tratta di strutture relativamente grandi e analoghe a quelle presenti sulla molecola di Cri j1. Recentemente, la tecnologia del DNA ricombinante ha fornito un valido mezzo per produrre e caratterizzare gli allergeni senza la necessità, che spesso comporta notevoli difficoltà, di estrarli dalla loro fonte naturale, i pollini. Partendo dal gene codificante per la proteina di interesse è infatti possibile conoscerne la sequenza aminoacidica completa, e questa informazione consente di capire meglio la funzione della proteina, la sua struttura tridimensionale e come questa può dare origine ad epitopi IgE, condivisi da allergeni diversi, che possono giustificare fenomeni di cross-reattività. Inoltre la produzione di questi allergeni da parte sistemi di espressione quali batteri, lieviti o cellule vegetali o animali, può fornire quantità di proteina estremamente superiori rispetto

alla tecnica estrattiva. In questo modo molti allergeni di Cupressacee e Taxodiacee sono stati clonati e caratterizzati (Tabella 1).

Il DNA dell'allergene Cup a1, ad esempio, è stato clonato e prodotto sia in diversi sistemi di espressione (53). In questo modo gli Autori hanno potuto ottenere sia la molecola glicosilata (prodotta dalla cellula eucariote) che quella non glicosilata (prodotta da *Escherichia Coli*). Quest'ultima è risultata essere costituita da 346 aminoacidi, con un altissimo grado d'identità con Jun a1, Cha o1, Cri j1 e una identità significativa con la famiglia delle pectato liasi. Il peso molecolare calcolato era di 37.5 kD ed il pI di 5.9. La sequenza comprendeva un possibile sito di glicosilazione e diversi siti di fosforilazione. La differenza tra il peso molecolare dedotto e quello osservato (43 kD) è dovuta all'assenza della componente glicidica nell'allergene prodotto da *Escherichia coli*. Da un punto di vista immunologico, l'analisi delle due proteine ricombinanti (glicosilata e non glicosilata) con sieri di pazienti allergici al polline di cipresso ha dimostrato che mentre la proteina glicosilata, al pari di quella naturale, riconosciuta dalle IgE di tutti i pazienti, quella non glicosilata era riconosciuta solo da una parte di questi ed in misura meno intensa, confermando l'importanza clinica dei carboidrati come strutture epitopiche. A questo proposito un interessante studio di confronto fra Cup a1 naturale e ricombinante non glicosilato (54) ha dimostrato che le IgE seriche di un gran numero di pazienti sensibili al Cup a 1 riconosce solo la componente glicidica della proteina glicosilata e che queste IgE sono in grado di indurre rilascio d'istamina dai basofili. Allo stesso modo il clonaggio del Cry j1 (55) ha confermato le informazioni ottenute con la molecola naturale: il polipeptide è costituito da 374 residui (per un peso molecolare calcolato di 38.5 kD) comprendenti cinque siti di glicosilazione che, se differentemente sostituiti possono dare origine a glicoproteine di peso variabile da 41 a 46 kD. Infine il gene codificante per il Cry j1 è risultato polimorfico, in altre parole esistente in molte varianti lievemente differenti, codificanti per proteine che differiscono fra loro per pochissimi aminoacidi. Anche il Cry j 1, come tutti gli allergeni di pollini di Cupressacee e Taxodiacee clonati, ha evidenziato l'alto grado d'omologia con gli altri allergeni della famiglia delle pectato liasi.

Per quanto riguarda il Gruppo 2 il primo allergene clonato è stato il Cry j2 (56) a cui sono seguiti il Cha o2 (57) e lo Jun a2 (58). L'appartenenza ad un gruppo d'allergeni è anche in questo caso giustificata dall'alta omologia riscontrata nella sequenza, anche se le dimensioni molecolari dei tre allergeni sono abbastanza diverse (42, 50,5 e 49 kD rispettivamente), dalla presenza di siti di glicosilazione conservati e dalla presenza d'aminoacidi funzionalmente importanti che fanno parte del sito attivo delle poligalatturonasi.



Due ulteriori allergeni sono stati clonati dal polline di *Juniperus* e sono stati denominati Jun a3 (da *J. ashei*) e Jun o4 (da *Juniperus oxycedrus*) in quanto non hanno nulla in comune con gli allergeni dei gruppi 1 e 2 (59, 60, 61). L'allergene Jun a 3 è composto da 199 aminoacidi, ha un peso molecolare dedotto di circa 21kD ed un sito di glicosilazione. La conoscenza della sequenza aminoacidica completa ha permesso di confermare la sua omologia con le proteine del tipo PR5 (pathogenesis-related protein) come suggerito per la proteina naturale. Sulla base delle omologie di sequenza è stato recentemente proposto un modello di struttura dello Jun a3 (62) che mette in evidenza la sua similitudine con altri aeroallergeni appartenenti alle PR proteins, mentre studi di reattività IgE con peptidi derivanti dalla proteina ricombinante, hanno permesso di localizzare sulla superficie della proteina un importante epitopo IgE. L'allergene Jun o4, originariamente identificato come Jun o2, è invece una proteina di 165 aminoacidi (18 kD) con 4 siti di legame per ioni calcio ed una omologia significativa con le calmoduline (Ca-binding proteins). Le Ca-binding proteins, agendo come proteine regolatrici del trasporto di calcio nella cellula, sono proteine ubiquitarie nelle cellule eucariote e molte molecole omologhe allo Jun o4 sono state evidenziate negli organismi superiori. Numerosi allergeni, fra cui Bet v3, Cyn d7, Ole e3 ed altri si sono rivelati appartenere a questa famiglia anche se l'omologia fra loro e con lo Jun o 4 è relativa solo alle porzioni di molecola caratteristiche della famiglia (motifs). E' interessante notare che l'autore ha osservato che il legame IgE-Jun o2 (oggi Jun o4) poteva essere inibito in modo quantitativamente diverso da estratti di diverse specie di Cupressacee, molto poco da un estratto di *Olea europea* o di *Lolium perenne* ed in modo significativo da uno di *Parietaria judaica*, anche se ad oggi non sono stati riportate osservazioni cliniche di cross-reattività fra *Juniperus* spp e *Parietaria* spp.



Fino ad oggi sono stati identificati e caratterizzati i seguenti allergeni appartenenti alle Cupressaceae e Taxodiaceae e precisamente:

Ch a o 1	<i>Chamaecyparis obtusa</i> , Cipresso Giapponese
Ch a o 2	<i>Chamaecyparis obtusa</i> , Cipresso Giapponese
Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i> , Cipresso Arizonica
Cup a 3	<i>Cupressus arizonica</i> , Cipresso Arizonica
Cup s 1	<i>Cupressus sempervirens</i> , Cipresso Mediterraneo,
Cup s 3	<i>Cupressus sempervirens</i> , Cipresso Mediterraneo,
Cup s Profilin	<i>Cupressus sempervirens</i> , Cipresso Mediterraneo,
Jun a 1	<i>Juniperus ashei</i> , <i>Juniperus sabinoidea</i> , Ginepro Sabino
Jun a 2	<i>Juniperus ashei</i> , <i>Juniperus sabinoidea</i> , Ginepro Sabino
Jun a 3	<i>Juniperus ashei</i> , <i>Juniperus sabinoidea</i> , Ginepro Sabino
Jun c 1	<i>Juniperus communis</i> , Ginepro Comune
Jun o 1	<i>Juniperus oxycedrus</i> , Ginepro Coccolone
Jun o 4	<i>Juniperus oxycedrus</i> , Ginepro Coccolone
Jun r 3	<i>Juniperus rigida</i> , Ginepro spinoso
Jun v 1	<i>Juniperus virginiana</i> , Ginepro
Jun v 3	<i>Juniperus virginiana</i> , Ginepro
Jun v 4	<i>Juniperus virginiana</i> , Ginepro
Thu p 1	<i>Thuja plicata</i> , Tuia

