

Gli allergeni molecolari: produzione e prospettive di utilizzo nella diagnostica allergologica (Rassegna)

Francesco Laureti
Phadia, Milano

INTRODUZIONE

Gli allergeni molecolari per la diagnostica allergologica possono essere prodotti sia per purificazione della naturale fonte allergenica oppure come proteine ricombinanti. La scelta del metodo dipende da diverse considerazioni, incluse varie conoscenze empiriche relative a proprietà qualitative, numerose opzioni di tipo tecnico e altre di tipo economico e di rendimento, oppure secondo le esigenze del progetto espresse in termini quantitativi. Per la produzione di elevate quantità di allergene l'approccio dei ricombinanti è indubbiamente il migliore.

Gli aspetti qualitativi di particolare interesse includono tutte le peculiarità che riguardano la funzione biologica degli allergeni nel loro proprio utilizzo, come il ripiegamento della proteina, le modificazioni post-translazionali e le variazioni nelle isoforme. Inoltre l'integrità proteica e la stabilità di stoccaggio sono fattori di fondamentale importanza nella scelta e nella definizione della tecnologia di produzione.

COMPONENTI ALLERGENICHE NATURALMENTE PURIFICATE

La purificazione di un allergene da una fonte naturale può essere ottenuta utilizzando una varietà di procedure cromatografiche. Determinata la disponibilità dell'idoneo anticorpo monoclonale, come primo passaggio di purificazione viene preferita la cromatografia di affinità biospecifica, spesso seguita da una cromatografia di esclusione dimensionale (*size exclusion*). Un vantaggio degli allergeni purificati naturalmente nei confronti di quelli ricombinanti, è la possibilità di ottenere un più elevato grado di corrispondenza con gli agenti sensibilizzanti, includendo le rappresentazioni delle isoforme, del ripiegamento delle proteine e delle modificazioni post-translazionali.

ALLERGENI RICOMBINANTI

La purificazione degli allergeni ricombinanti è un processo più complesso poiché prevede la clonazione di un gene che codifica l'allergene e sviluppa un sistema per l'espressione delle proteine in ospite straniero. Sono disponibili diversi sistemi esterni e ben adatti per l'espressione di proteine ricombinanti. Un vantaggio significativo della produzione dei ricombinanti consiste nella possibilità di applicare una generica prima cromatografia di affinità, grazie all'aggiunta di un piccolo segmento di esa-istidina alla proteina, conferendole affinità per ioni metallo bivalenti come lo ione Ni^{2+} immobilizzato in una matrice di separazione. Un altro vantaggio importante è che il materiale grezzo per la purificazione viene generato da un processo di coltivazione altamente controllato, risultando così una fornitura virtualmente infinita di materiale di approvvigionamento con minime variazioni da lotto a lotto.

Il sistema più comune è basato su un ceppo di enterobatteri gram-negativi (*Escherichia coli*), e questo rappresenta spesso una scelta di primo livello per qualsiasi obiettivo. In alcuni casi l'*Escherichia coli* produrrà una proteina solubile che potrà immediatamente essere purificata con alti rendimenti. Più frequentemente, la proteina verrà depositata nelle cellule come particella insolubile. Tale proteina potrà in alcuni casi essere solubilizzata e successivamente riavvolta *in vitro*, come una parte del processo di purificazione. Nel caso in cui questo non sia possibile, la soluzione va ricercata nell'utilizzare un altro sistema di espressione. Un sistema alternativo frequentemente utilizzato consiste nel fermentare le cellule che possono essere manipolate per secernere le proteine nel terreno di coltura. Un altro sistema ancora è rappresentato da colture di insetto che offrono una via alternativa per la produzione di proteine ricombinanti. Sebbene sia i lieviti che le cellule di insetto rappresentino opzioni secondarie eccellenti per la produzione di allergeni ricombinanti, essi richiedono tempi di coltivazione più lunghi e forniscono rese tipicamente inferiori rispetto all'*Escherichia coli* e sono perciò un'alternativa meno vantaggiosa. La tecnologia ricombinante assicura una qualità costante nel tempo: permette la produzione di elevate quantità di antigeni e garantisce alti livelli di purezza con elevata stabilità proteica anche nella struttura conformazionale.

Produzione e controllo qualità

Indifferentemente dalla tecnologia di produzione per gli allergeni molecolari, la qualità e l'affidabilità sono assicurate dai criteri e dagli standards. Una volta che sia stato definito un opportuno concetto di preparazione per un allergene naturale o ricombinante, segue una fase di sviluppo del processo di produzione (Fig. 1). Questo aspetto include l'ottimizzazione dei singoli procedimenti, dei test di

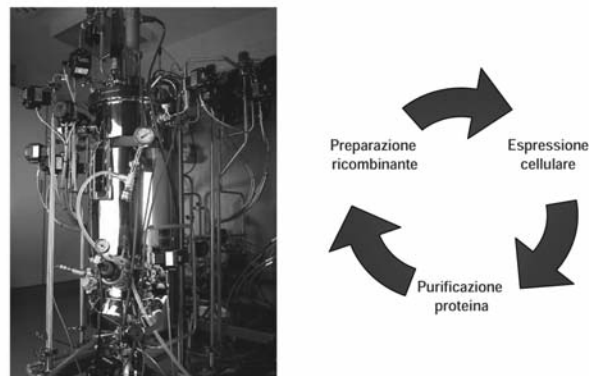


Figura 1
Sistema di analisi e controllo nella produzione di allergeni

robustezza e di resistenza. Stabilito il disegno finale del processo, deve essere verificata e validata l'abilità del processo stesso di assicurare una riproducibilità del prodotto che incontri i criteri di qualità predefiniti. Questi criteri includono proprietà funzionali sia biochimiche che immunologiche, come anche la stabilità di stoccaggio e di utilizzo. In secondo luogo, la facilità di produzione e la semplicità pratica sono di fondamentale importanza per la qualità. L'apparecchiatura per la produzione deve essere in grado di garantire un'ampia varietà di sistemi di controllo che sono essenziali per la standardizzazione dei lotti, e di registrare tutti i parametri del processo. Come terzo aspetto, la strumentazione e le procedure di produzione devono includere rigorosi e validati protocolli per prevenire le contaminazioni tra processi di produzione consecutivi. Infine, ogni lotto di proteine, prodotto con un processo validato, deve documentare il rispetto di tutte le proprietà richieste per sostenere le funzioni specificate. Il superamento di questi criteri, insieme alla registrazione dei parametri di processo approvati, costituiscono le basi per la delibera dei singoli lotti e l'idoneità all'uso del prodotto.

CARATTERISTICHE PRINCIPALI DELLE PROTEINE ALLERGENICHE

Le proteine dotate di capacità antigenica, oltre a rappresentare una molecola non appartenente all'organismo in cui manifestano tale capacità, posseggono caratteristiche chimico-fisiche che consentono loro di stimolare il sistema immunitario sufficientemente a lungo da provocare una risposta biologica. Il peso molecolare, per esempio, è solitamente elevato e comunque definito in un determinato intervallo (5.000 – 150.000 Da), così come il punto isoelettrico (4 – 7) e la struttura conformazionale (Fig. 2).

Le proteine allergeniche possono appartenere al regno vegetale o al regno animale e possono svolgere funzioni di diversa natura, come per esempio attività enzimatiche, metaboliche, strutturali o di deposito. Alcuni allergeni, ma non tutti, sono glicosilati oppure possono avere altre modificazioni post-translazionali. Ovviamente perché un allergene possa scatenare una reazione allergica deve poter penetrare l'organismo attraverso le membrane mucose ed essere presentato al sistema immunitario. Questo può accadere nel sistema respiratorio, nel tratto gastrointestinale, nella pelle, etc.



Figura 2
Esempio di struttura conformazionale di proteina antigenica

Similarità strutturale delle proteine allergeniche

Le famiglie di proteine con capacità antigenica sono costituite da allergeni con un'elevata similarità strutturale anche per quanto riguarda la struttura terziaria. La mappatura aminoacidica delle proteine rappresenta un passaggio fondamentale per gli studi di *multialignment* tra allergeni correlati e rivela il loro grado di cross-reattività nell'ambito della stessa famiglia. Le PR-10, per esempio, note anche come "proteine Bet v 1 omologhe", largamente distribuite nel regno vegetale, mostrano un elevato livello di omogeneità che tuttavia decresce partendo dall'ordine delle *Fagales*, passando attraverso la famiglia delle *Rosaceae* per arrivare fino alle *Apiaceae*. Le similarità strutturali tra le proteine allergeniche sono in linea con il livello di relazione biologica tra le specie (Fig. 3).

La similarità delle proteine allergeniche è il presupposto su cui si basano i fenomeni di cross-allergia. Le reazioni avverse contro gli alimenti osservate in pazienti allergici al polline di betulla sono originariamente mediate da anticorpi IgE contro il Bet v 1, indotti dal polline di betulla, che cross-reagiscono con le proteine Bet v 1 omologhe presenti in diversi alimenti vegetali. Così anche le reazioni avverse contro gli alimenti animali, come crostacei e molluschi, osservate in pazienti allergici agli acari della polvere sono nella maggior parte dei casi originariamente mediate da anticorpi IgE contro il Der p 10, indotti dall'acaro, che cross-reagiscono con le proteine Der p 10 omologhe presenti in diversi invertebrati¹ (Fig. 4) che rappresentano prelibatezze gastronomiche ormai sempre più frequenti sulle nostre tavole.

Le più studiate componenti molecolari allergeniche distribuite largamente soprattutto nel mondo vegetale appartengono alle famiglie delle proteine PR-10, delle ns-LTP (*non-specific Lipid Transfer Protein*), delle Profiline (Bet v 2 omologhe), delle proteine di deposito (2S albumine, 7S/11S globuline). L'appellativo panallergene è ormai usato in letteratura per identificarle come allergeni ampiamente diffusi e in grado di cross-reagire sierologicamente anche tra specie distanti filogeneticamente. La famiglia delle ns-LTP è stata una delle prime a dimostrare che oltre alla mappatura aminoacidica è importante conoscere la struttura conformazionale e la funzione delle proteine allergeniche. Infatti le ns-LTP sono resistenti alle alte temperature, alle proteolisi e a pH estremi grazie alla loro conformazione sterica rigidamente conservata da legami disolfuro.



Figura 3
Similarità strutturale: esempio di un modello di reattività crociata riferita a una proteina PR-10

	<i>Mytilus edulis</i> (Blue mussel)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Schistosoma haematobium</i> (Trematode)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i> (Scallop)	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematode)	<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly)	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (House dust mite)	<i>Locusta migratoria</i> (Locust)	<i>Blattella germanica</i> (German cockroach)	<i>Charybdis feriatius</i> (Crab)	<i>Homarus americanus</i> (Lobster)
<i>Penaeus aztecus</i> (Shrimp)	57%	57%	60%	62%	71%	78%	81%	82%	83%	92%	99%
<i>Homarus americanus</i> (Lobster)	57%	57%	60%	62%	71%	79%	81%	82%	83%	92%	
<i>Charybdis feriatius</i> (Crab)	56%	60%	58%	62%	73%	81%	83%	84%	84%		
<i>Blattella germanica</i> (German cockroach)	57%	55%	56%	60%	69%	86%	81%	90%			
<i>Locusta migratoria</i> (Locust)	59%	57%	57%	61%	71%	88%	81%				
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (House dust mite)	56%	59%	59%	62%	72%	77%					
<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly)	54%	56%	56%	60%	69%						
<i>Caenorhabditis elegans</i> (Nematode)	56%	60%	57%	60%							
<i>Mizuhopecten yessoensis</i> (Scallop)	68%	55%	64%								
<i>Schistosoma haematobium</i> (Trematode)	58%	50%									
<i>Homo sapiens</i>	54%										

Figura 4
Identità della sequenza aminoacidica tra tropomiosine da diversi organismi. Da Rif. 1 (per concessione dell'autore)

I determinanti carboidratici cross-reattivi

Molte proteine dei pollini e dei veleni di insetto sono in realtà glicoproteine, la cui struttura carboidratica è meglio conosciuta come CCD (*Cross-reactive Carbohydrate Determinants*). Le CCD sono componenti stabili e presenti anche in molti alimenti di natura vegetale. La cross-reattività mediata dalle CCD sembra essere un fenomeno principalmente sierologico, ma alcuni recenti studi non escludono una qualche rilevanza clinica.

LA COMPONENT RESOLVED DIAGNOSIS (CRD)

La disponibilità di tecnologie diagnostiche immunometriche basate sulla singola componente molecolare di un estratto nativo, permette di determinare con precisione gli anticorpi IgE specifici esclusivamente per quella componente (Fig. 5). Ne consegue la capacità di stabilire quantitativamente un profilo di reattività individuale delle IgE per il paziente sensibilizzato.

Sebbene il Sottocomitato dell'*International Union of Immunological Societies* (IUIS) per la nomenclatura degli allergeni abbia classificato oltre 1700 molecole allergeniche, gli studi biologici ed immunologici hanno mostrato che molti allergeni ricombinanti si comportano similmente alla loro controparte naturale ed è sufficiente un limitato numero di allergeni ricombinanti per diagnosticare la maggior parte dei casi di allergia ai pollini o di graminacee.

Come evidenziato nella Figura 6 l'utilizzo di un pannello di ricombinanti per la *Phleum pratensis* per fare diagnosi di sensibilizzazione alle graminacee, per esempio, riproduce al 99% l'intera capacità di legame dell'estratto allergenico di polline di g6 (n=150).

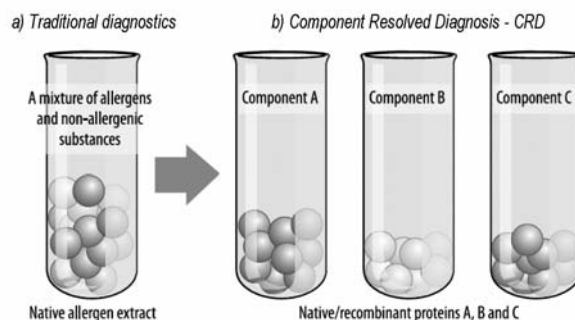


Figura 5
La CRD, ovvero la ricerca di IgE componenti specifiche, permette di determinare il profilo di reattività individuale degli anticorpi IgE per il paziente.

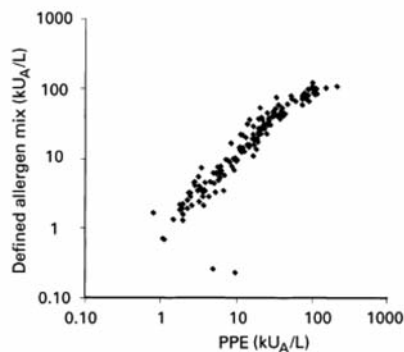


Figura 6
Allergia a graminacee: utilizzo di un pannello di ricombinanti per *Phleum pratensis* rispetto all'estratto allergenico (g6). Da Rif. 2 (per concessione dell'autore)

CONCLUSIONI

L'impulso dato alla ricerca dalle tecnologie DNA ricombinanti ha consentito rapidi e significativi progressi nel campo della produzione delle componenti allergeniche molecolari. Il preciso profilo di sensibilizzazione che oggi può fornire la CRD, identifica con certezza la componente molecolare responsabile della sintomatologia allergica. Il maggior bagaglio di informazioni utili per il clinico che la diagnostica molecolare é in grado di fornire apre interessanti prospettive per un importante miglioramento della gestione del paziente allergopatico. Anche la medicina di laboratorio potrà cambiare il suo approccio per la diagnostica delle allergie di tipo I e, molto probabilmente, per il monitoraggio dei livelli sierici di IgG/IgG₄ nei pazienti sottoposti ad immunoterapia iposensibilizzante.

BIBLIOGRAFIA

1. **A.M. DeWitt, L. Mattsson, I. Lauer, et al.** Recombinant tropomyosin from *Penaeus aztecus* (rPen a 1) for measurement of specific immunoglobulin E antibodies relevant in food allergy to crustacean and other invertebrates. *Mol- Nutr. Food Res.* 2004; 48: 370-9
2. **R. Valenta, J. Lidholm, V. Niederberger, et al.** The Recombinant allergen-based concept of Component resolved diagnosis and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clinical and Experimental Allergy*, 1999; 29: 896-904

Per corrispondenza:

Dott. Francesco Laureti
Phadia
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel.: 0264163423 - Fax: 0264163415
e-mail: francesco.laureti@phadia.com