

EL POLEN COMO VECTOR RESPONSABLE DE ALERGIAS

Alché, J.D. & Rodríguez-García, M.I.

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.
Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda 1. 18008 Granada.

Manuscrito recibido el 10 de Febrero de 1997, aceptado el 19 de Febrero de 1997

ÍNDICE

Introducción	6
El polen como agente productor de alergias	7
Concepto de alergia	7
Plantas con polen alergogénico	7
Caracterización bioquímica y molecular de los alergenos	8
Alergenos caracterizados	10
Otros alérgenos: profilinas	10
Alérgenos del olivo	11
Localización de las proteínas alergénicas en el grano de polen	12
Optimización de las técnicas de obtención de anticuerpos	12
Mejoras en el procesamiento de muestras para microscopía electrónica	12
Análisis de la expresión génica: localización de los transcritos	15
Funciones biológicas de los alergenos	15
Perspectivas futuras	16
Bibliografía	17

RESUMEN: El desarrollo del polen tiene lugar durante una fase crítica del ciclo de vida de las plantas, constituyendo la transición entre la fase esporofítica y la gametofítica. Durante este desarrollo tiene lugar la síntesis de proteínas específicas del gametofito. Se conoce que algunas de estas proteínas son capaces de desencadenar una respuesta alérgica en el hombre conocida como "polinosis". Aunque todos los pólenes son potencialmente alergénicos, son las especies anemófilas las que presentan una mayor incidencia en la etiología de la polinosis. Estos alergenos han sido recientemente purificados y caracterizados en un número reducido de especies. Los genes que codifican estas proteínas también están siendo clonados. Finalmente, la localización celular de estas proteínas es otro de los objetivos que se están llevando a cabo en las pocas especies hasta ahora objeto de estudio. Todos estos abordajes son fundamentales para llegar a determinar el hasta ahora prácticamente desconocido papel biológico de estas proteínas en el desarrollo del polen. En este trabajo se presenta una revisión de la situación actual de estos estudios, con una especial referencia al polen del olivo, por tratarse de una especie ampliamente representada en nuestra región y con un gran impacto tanto económico como alergogénico.

PALABRAS CLAVE: Polen, polinosis, alergia, alergenos, caracterización, localización, papel biológico, expresión génica, olivo (*Olea europaea* L.).

ABSTRACT: Pollen development occurs during a critical phase in the lifecycle of plants, spanning the transition between the sporophytic and the gametophytic phase. The synthesis of gametophyte-specific proteins takes place during this development. Some of these proteins are known to cause an allergenic response in humans which is commonly called "hay fever". Although all pollens are potentially allergenic, anemophilous species display a higher incidence in the aetiology of hayfever. Allergens have been recently purified and characterised within a reduced number of species. Genes encoding some of the proteins are also being cloned. Finally, cellular localisation of these proteins is also being carried out in the reduced number of species currently under study. All these approaches are fundamental for the determination of the presently unknown biological function which these proteins have in pollen development. This paper is a review of the state of the art in studies of this kind, with special reference to olive pollen, which is wide-spread in our region, as well as being an important economic and allergenic factor.

KEY WORDS: Pollen, hay fever, allergy, allergens, characterisation, localisation, biological function, gene expression, olive (*Olea europaea* L.).

INTRODUCCIÓN

El ciclo de vida de las plantas con flores alterna entre una generación esporofítica diploide y una generación gametofítica haploide. El grano de polen constituye la expresión de la fase gametofítica masculina en las plantas con flores, y contiene los gametos masculinos o sus células progenitoras, jugando un papel fundamental en la reproducción de las plantas superiores. Esta estructura es uno de los sistemas celulares aislados más simples que se conocen. Básicamente consta de una célula vegetativa rodeada por una compleja pared externa, cuyo citoplasma engloba a las células espermáticas (o a su progenitora, la célula generativa). El grano de polen es liberado de la planta esporofítica, y en el momento en que llega hasta un estigma adecuado germina, formando rápidamente el tubo polínico a través del cual son transportadas las células espermáticas hasta el ovario, donde tiene lugar la fertili-

zación. La diversidad en forma y estructura sugiere que los diferentes tipos de granos de polen han surgido a partir de un extraordinario proceso de adaptación a muy diferentes factores que incluyen el medio ambiente, la interacción con otros individuos y el modo de dispersión por el viento, agua, o por la acción de animales (KNOX, 1984, HORMAZA & HERREIRO, 1995). Aunque todos los pólenes son potencialmente alergogénicos, son sin embargo los pólenes que se dispersan por el aire (anemófilos) los que presentan una mayor capacidad para producir alergias debido a la elevada concentración de polen en el aire. La baja probabilidad de que el polen transportado por el aire llegue a fecundar el estigma apropiado ha sido compensada evolutivamente por un incremento en la producción de polen en las especies con polinización anemófila (PACINI, 1990).

El objetivo fundamental de este artículo es aportar una visión general sobre

los alérgenos polínicos, con especial referencia a aquellos del olivo (*Olea europaea* L.).

EL POLEN COMO AGENTE PRODUCTOR DE ALERGIAS

Concepto de alergia. Cuando una respuesta inmunitaria adaptativa se produce de forma exagerada o inapropiada, se aplica el término médico de hipersensibilidad. Se han descrito cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad. Entre ellas, la hipersensibilidad de tipo I o inmediata (conocida comúnmente como alergia) tiene lugar cuando se dirige una respuesta IgE contra antígenos inocuos (denominados en este caso alérgenos), con la liberación consiguiente de mediadores farmacológicos como la histamina por las células mastoides sensibilizadas por esa IgE (BROSTOFF & HALL, 1991). Los síntomas asociados a la liberación de estos mediadores van desde un cuadro de estornudos, rinorrea, obstrucción de las vías nasales, prurito conjuntival y faríngeo y lagrimeo en el caso de la frecuente rinitis alérgica, hasta los más graves correspondientes al asma alérgico. En otros casos, las afecciones cursan a través de inflamaciones de la piel, en el caso de las dermatitis de contacto.

Las proteínas causantes de estos episodios alérgicos se pueden encontrar en los alimentos y producir alergias por ingestión, pueden ser inyectadas por un vector (generalmente insectos o arácnidos), o transferirse a los individuos

mediante el contacto con órganos de plantas tales como las hojas, tallos o espinas (TOVEY & BALDO, 1987). Sin embargo, una de las causas más frecuentes de alergias son los alérgenos inhalados, entre los que figuran los alérgenos de los ácaros del polvo, y los alérgenos del polen. En este último caso la alergia inducida recibe en nombre de "polinosis".

Plantas con polen alergogénico. Como ya ha sido apuntado anteriormente, el carácter alergénico del polen es debido a la presencia en el grano de ciertas proteínas cuya localización, origen y papel biológico (prácticamente desconocido) son objeto de controversia. No hay duda, sin embargo, de su capacidad para actuar como alérgenos.

Los postulados que determinan el que un tipo de polen sea capaz de sensibilizar a un sujeto atópico, produciéndole síntomas clínicos, fueron ya definidos por THOMMEN en 1931. El polen alergogénico debe reunir las siguientes características: a) contener un componente antigénico capaz de inducir sensibilidad, b) pertenecer a una planta anemófila, c) producirse en grandes cantidades, d) ser lo suficientemente ligero para poder ser desplazado largas distancias, y e) pertenecer a una planta ampliamente representada.

Los estudios realizados hasta la fecha indican que el polen correspondiente a gramíneas es, con diferencia, la más importante causa de polinosis en toda

Europa. En Europa del Norte, el polen de la familia Betulaceae, Corylaceae y algunos miembros de la familia Coniferaeae contribuye significativamente a la incidencia de polinosis, mientras que el polen de *Parietaria judaica* y de *Olea europaea* son los responsables de la mayoría de las polinosis en las regiones mediterráneas. La prelevancia de polinosis en Europa debidas al polen de Cupressaceae, Fagaceae, *Platanus* y varios otros grupos como Chenopodiaceae, Compositae y Salicaceae, aunque ha sido indicada en varios casos, no ha sido aún suficientemente estudiada (D'AMATO & al., 1992). Ésto no implica que pólenes de otras especies no puedan ser alérgicos. De hecho se han indicado algunos casos de alergia a polen no atmosférico o proveniente de plantas que tienen una distribución limitada en Europa, como *Trifolium* o *Ambrosia* (DECHAMPS & DEVILLER, 1990), aunque como regla general, no deben considerarse como causas significativas de polinosis en Europa.

Caracterización bioquímica y molecular de los alérgenos. El aislamiento y caracterización de las proteínas del polen responsables de las alergias constituye un objetivo de investigación prioritario durante los últimos años. La mayor parte de los pólenes capaces de desarrollar una respuesta alérgica son multialérgicos, es decir, sus extractos proteicos contienen a veces hasta varias decenas de componentes alérgicos. Se determinan alérgenos principales o ma-

yoritarios aquellos para los que se detecta IgE específica en más del 50% de los pacientes atópicos, mientras que aquellos para los cuales se detectan porcentajes menores de IgE se denominan alérgenos secundarios (KING, 1979).

Los alérgenos se denominan de acuerdo al sistema de nomenclatura aprobado por la IUIS (International Union of Immunological Societies) (MARSH & al., 1987): las tres primeras letras del género (en letra itálica), espacio; la primera letra del nombre de la especie (en letra itálica), espacio; y un número romano, ocasionalmente seguido de una letra minúscula para diferenciar isoalérgenos o formas alérgicamente similares pero que presentan formas físico-químicas diferentes (peso molecular, punto isoeléctrico etc.).

Hasta la fecha, numerosos alérgenos polínicos han sido identificados, purificados y caracterizados bioquímicamente (ver revisiones de TOVEY Y BALDO, 1987; IPSEN & HANSEN, 1990; ROHAC & al., 1991; AVJIOGLU & al., 1994). Los alérgenos del polen suelen ser proteínas y glicoproteínas hidrosolubles de bajo peso molecular (5-70 kDa), con punto isoeléctrico en el rango 4-6, y que constituyen un grupo muy heterogéneo.

Los estudios consistentes en la comparación de las secuencias de aminoácidos e hidrofobicidad de diferentes alérgenos indican que no hay una relación aparente entre las propiedades intrínsecas de

ESPECIE	ALERGENO	REFERENCIA
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Aln g I</i>	BREITENEDER & al., (1992)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	<i>Amb a I</i>	RAFAR & al., (1991)
	<i>Amb a II</i>	ROGERS & al., (1991)
	<i>Amb a V</i>	GHOSH & al., (1993)
<i>Ambrosia psilostachya</i>	<i>Amb p V</i>	GHOSH & al., (1994)
<i>Ambrosia trifida</i>	<i>Amb t V</i>	GHOSH & al., (1991)
<i>Betula verrucosa</i>	<i>Bet v I</i>	BREITENEDER & al., (1989)
		SWOBODA & al., (1995)
	<i>Bet v III</i> <i>Profilina</i>	SEIBERLER & al., (1994) VALENTA & al., (1991)
<i>Carpinus betulus</i>	<i>Car b I</i>	LARSEN & al., (1992)
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	<i>Cha o I</i>	SUZUKI & al., (1996)
<i>Corylus avellana</i>	<i>Cor a I</i>	BREITENEDER & al., (1993)
<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>Cry j I</i>	SONE & al., (1994)
	<i>Cry j II</i>	KOMIYAMA & al., (1994)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Lol p I</i>	PEREZ & al., (1990) GRIFFITH & al., (1991)
	<i>Lol p IX</i>	SINGH & al., (1991)
<i>Olea europaea</i>	<i>Ole e I</i>	VILLALBA & al., (1994)
		LOMBARDERO & al., (1994)
<i>Parietaria judaica</i>	<i>Par j I</i>	COSTA & al., (1994)
<i>Poa pratensis</i>	<i>Poa p IX</i>	SILVANOVIK & al., (1991)
<i>Phleum pratense</i>	<i>Phl p II</i>	DOLECEK & al., (1993)
	<i>Phl p Va</i>	BUFE & al., (1994)
	<i>Phl p VI</i>	PETERSEN & al., (1995)
<i>Syringa vulgaris</i>	<i>Syr v I</i>	BATANERO & al., (1994a)

TABLA 1. Alergenos clonados hasta la fecha.

la proteína y su carácter alérgico (VRTALA & al., 1993). Sin embargo, la presencia de coincidencias en la secuencia de aminoácidos de diversos alérgenos ha servido para explicar la existencia de reacciones cruzadas que tienen lugar especialmente entre miembros de taxones relacionados (IPSEN & HANSEN 1990, 1991).

Alergenos caracterizados. El clonaje y la expresión de alérgenos mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante ha facilitado la identificación, caracterización y análisis de las regiones inmunoreactivas de estas moléculas. El número de alérgenos que han sido clonados y secuenciados ha crecido enormemente (CHAPMAN, 1991), ya que estos métodos representan una alternativa más rápida y efectiva que los métodos tradicionales de purificación de proteínas (AVJIOGLU & al., 1994). De forma adicional, el conocimiento de la secuencia de los alérgenos permite la búsqueda de similitudes en bases de datos de DNA y proteínas, y por tanto el obtener pruebas indirectas de la posible función biológica de estas proteínas en el grano de polen. (ver Tabla I para los alérgenos polínicos clonados hasta la fecha).

Otros alérgenos: profilinas. Las profilinas son proteínas de bajo peso molecular de las que se conoce su función en la regulación de la polimerización de la actina gracias a su capacidad de unión a los monómeros de actina en la célula. Su presencia se ha descrito en células

animales desde hace bastante tiempo, mientras que ha sido recientemente cuando se ha verificado su presencia y su relación bioquímica con la actina en el polen de plantas superiores (VALENTA & al., 1993).

Las profilinas han sido caracterizadas como pan-alérgenos, responsables de la reactividad cruzada existente entre muchas especies vegetales (GROTE, 1988; VALENTA & al., 1991; 1992). Están presentes en el polen de numerosos árboles, hierbas y arbustos y reaccionan con la IgE de un alto porcentaje de enfermos alérgicos (van REE & al., 1992). Sin embargo, cuando se probaron Western blots de extractos de polen de olivo y otras oleáceas con un anticuerpo policlonal anti-profilinas de abedul, no pudo establecerse la presencia de bandas de reacción cruzada en torno a los 14 kDa (peso molecular correspondiente a las profilinas) (MARTÍN-OROZCO, 1994).

Las profilinas del olivo han sido recientemente aisladas, y están siendo objeto de estudio (comunicación personal Dr. R. RODRÍGUEZ & al., Dept. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid).

Alergenos del olivo. El interés por el estudio del polen del olivo como fuente de alérgenos comenzó a principio de los 80, con la identificación de diversos alérgenos (BLANCA & al., 1983; VELA & al., 1982). Entre esos alérgenos, dos proteínas denominadas *Ole e 1* y

Ole e II fueron purificadas y caracterizadas, y son consideradas los alérgenos mayoritarios del polen del olivo (LAUZURICA & al., 1988a y 1988b). En este estudio, el alérgeno mayoritario *Ole e I* fue separado mediante SDS-PAGE bidimensional en dos bandas de 17 y 19 kDa, aunque posteriormente se mostraron heterogeneidades respecto a sus valores de pI (WHEELER & al., 1990). Por su parte, *Ole e II* mostró un peso molecular de 8. La naturaleza glicoproteica de *Ole e I* fue sugerida inicialmente por LAUZURICA & al., (1988b) y por VILLALBA & al., (1990, 1993) a partir de los datos de la secuencia de la proteína. Este hecho fue confirmado posteriormente por BATANERO & al., (1994b), quienes determinaron el sitio de glicosilación de la proteína y aportaron pruebas de que la porción glicosídica está implicada en el carácter alérgico. Se han obtenido diversos anticuerpos monoclonales frente a antígenos del olivo, entre los que destaca el anticuerpo monoclonal OL-1 que reconoce al alérgeno *Ole e I* pero no a *Ole e II* (LAUZURICA & al., 1988a).

La existencia de fenómenos de reacción cruzada entre los extractos de diversos miembros de la familia Oleaceae fue determinada inicialmente por OBISPO & al., (1993). También se ha detectado la presencia de determinantes antigénicos comunes y/o de reacción cruzada con extractos de polen procedentes de otras especies (VELA & al., 1982; BOUSQUET & al., 1985; KENERMAN & al., 1992; BALDO & al., 1992). El uso de

una batería de anticuerpos monoclonales ha permitido recientemente el mapeo de los determinantes antigénicos de la molécula de *Ole e I*, y ha confirmado la presencia de estos determinantes en varios miembros de esta familia (MARTÍN-OROZCO & al., 1994).

VILLALBA & al., (1994) y LOMBARDEO & al., (1994) han clonado y secuenciado varios cDNAs que codifican este alérgeno a partir de RNA total de polen mediante reacciones de PCR usando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia aminoacídica de *Ole e I*. En dicha secuencia existen microheterogeneidades que explican el elevado grado de polimorfismo de la proteína natural. Uno de esos cDNAs fue utilizado para sobreexpresar una proteína recombinante en forma de proteína de fusión, que es reconocida tanto por el anticuerpo monoclonal OL-1 como por un anticuerpo policlonal y por la fracción IgE del suero de pacientes alérgicos al polen del olivo (VILLALBA & al., 1994). Esta proteína recombinante es potencialmente utilizable en la diagnosis y en la terapia de estos pacientes, ya que para este tipo de tratamientos se requieren grandes cantidades de proteína pura y bien definida.

LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ALERGÉNICAS EN EL GRANO DE POLEN

La localización celular de las proteínas alérgicas permite conectar los resultados bioquímicos con las caracte-

terísticas morfológicas de la célula. Asimismo, el uso de técnicas de localización puede aportar datos sobre los posibles mecanismos de liberación de estas proteínas cuando el polen entra en contacto con fluidos fisiológicos (GROTE & al., 1988), ayudando a conocer el papel biológico de estas proteínas. Igualmente permiten detectar no sólo los lugares de almacenamiento, sino también sus lugares de síntesis y/o de modificación a nivel post-traducción. Estos hechos explican la existencia de trabajos de inmunolocalización de los alérgenos ya desde los años 60 (ver revisiones de KNOX, 1984; AVJIOGLU & al., 1994). Los progresos en este campo han corrido paralelos al desarrollo de diversas tecnologías, sobre todo en dos aspectos fundamentales:

Optimización de las técnicas de obtención de anticuerpos. La utilización inicial en inmunocitoquímica de sueros policlonales (en algunos casos sueros desarrollados frente a extractos crudos polínicos), junto a la utilización de marcadores como fluoresceína (para microscopía de fluorescencia) o ferritina (para microscopía electrónica), conducía a resultados poco específicos de localización. Resultados igualmente poco específicos se han obtenido tras usar IgE de pacientes alérgicos, dada la existencia de múltiples proteínas capaces de producir respuesta IgE en la mayoría de los pólenes alérgicos.

El desarrollo de técnicas de purificación de los alérgenos ha corrido paralelo

a la utilización de sueros policlonales ya preparados frente a alérgenos purificados, o incluso frente a alérgenos recombinantes. Estas mejoras han supuesto un incremento en la especificidad de la inmunolocalización. Con el desarrollo de los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales, la especificidad de la inmunolocalización llega hasta el punto de poder distinguir entre epitopos de un mismo alérgeno. Son por tanto este tipo de anticuerpos la herramienta de elección en aquellos casos en que son disponibles.

Mejoras en el procesamiento de muestras para microscopía electrónica. La mayoría de los alérgenos del polen que han sido identificados hasta la fecha se caracterizan por ser moléculas de bajo peso molecular muy hidrosolubles. Por ello se ha recomendado no usar fijaciones convencionales con fijadores acuosos para evitar la movilización de estas proteínas, y por tanto una localización artefactual de las mismas. Se han utilizado preferencialmente técnicas de fijación anhidra (STAFF & al., 1990; GROTE 1991; GROTE & al., 1994) para la localización de los alérgenos mayoritarios correspondientes en *Lolium* y *Betula*. La preservación ultraestructural tras la utilización de estas técnicas es relativamente pobre. A pesar de ello, se consideraba que el marcado obtenido tras la inmunolocalización era mayor y más real (GROTE, 1992).

Más recientemente se ha comprobado que tras utilizar técnicas convencionales (acuosas) de fijación, e inclusión

ESPECIE	ALERGENO	TÉCNICA	TIPO ANTICUERPO	LOCALIZACIÓN CELULAR	REFERENCIA
<i>Ambrosia trifida</i>	varios	MF	P	pared y aperturas	KNOX & al., 1970
<i>Betula verrucosa</i>	varios	MF	P	exterior pared	BELIN & ROWLEY, 1971
	<i>Bet v</i> I; varios	MET	M/P	matriz citoplásmica/pared	GROTE, 1991, 1992
	varios	MET	P	varios tejidos de la antera	GROTE Y FROMME, 1986
<i>Cryptomeria japonica</i>	<i>Cry j</i> I	MF	P	pared	TAKAHASHI & al., 1989
	<i>Cry j</i> I	MET	Ms/P	pared, Golgi; restos tapetum	MIKI-HIROSIGE & al., 1994
<i>Forsythia suspensa</i>	<i>Ole e</i> I	MO/MET	Ms	retículo endoplásmico	FERNÁNDEZ & al., 1996
	<i>Ole e</i> I	MET	M	retículo endoplásmico	RODRÍGUEZ-GARCÍA & al., 1995b
<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Ole e</i> I	MO/MET	Ms	retículo endoplásmico	FERNÁNDEZ & al., 1996
	<i>Ole e</i> I	MET	Ms	retículo endoplásmico	RODRÍGUEZ-GARCÍA & al., 1995b
<i>Gladiolus gandavensis</i>	varios	MF	P	pared	KNOX & al., 1970
<i>Ligustrum vulgaris</i>	<i>Ole e</i> I	MO/MET	Ms	retículo endoplásmico	FERNÁNDEZ & al., 1996
	<i>Ole e</i> I	MET	Ms	retículo endoplásmico	RODRÍGUEZ-GARCÍA & al., 1995b
<i>Lolium perenne</i>	Grupo 1 y antígeno A <i>Lol p</i> 1	MF	P(IgG)	citoplasma y pared citoplasma y pared	HOWLETT & al., 1981; KNOX & al., 1980 STAFF & al., 1990
		MET	Ms/ IgE pacientes		
<i>Olea europaea</i>	<i>Ole e</i> I	MO/MET	Ms/P	retículo endoplásmico	FERNÁNDEZ & al., 1996
	<i>Ole e</i> I	MET	Ms	retículo endoplásmico	MARTÍN-OROZCO & al., 1994 RODRÍGUEZ-GARCÍA & al., 1995a,b
<i>Parietaria judaica</i>	varios	MET	P/IgE pacientes	no específico; aperturas y pared	CASAS & al., 1996
<i>Phleum pratense</i>	<i>Phl p</i> I; <i>Phl p</i> V	MET	M/P	matriz citoplásmica y pared	GROTE & al., 1994
<i>Syringa vulgare</i>	<i>Ole e</i> I	MO/MET	Ms	retículo endoplásmico	FERNÁNDEZ & al., 1996
	<i>Ole e</i> I	MET	Ms	retículo endoplásmico	RODRÍGUEZ-GARCÍA & al., 1995b

TABLA 2. Localización de alérgenos en el grano de polen. Estudios fundamentales realizados hasta la fecha. MO: Microscopía Óptica; MF: Microscopía de Fluorescencia; MET: Microscopía Electrónica de Transmisión; M: Monoclonal; P: Policlonal.

en Epon, era posible obtener una localización específica, con un intenso marcado. Este es el caso del olivo (*Olea Europaea* L.), en el que el alérgeno mayoritario *Ole e I* demuestra ser una proteína termoestable cuya antigenicidad se mantiene incluso tras polimerizar a 60° C. y su localización es específica del retículo endoplásmico (MARTIN-OROZCO 1994, RODRIGUEZ-GARCIA & al., 1995a; 1995b, FERNÁNDEZ & al., 1996).

Las ventajas de la utilización de métodos de criofijación y criosustitución en estudios morfológicos, inmunocitoquímicos, de hibridación *in situ* y microanálisis han sido ampliamente documentadas (ROOS & MORGAN, 1990). Sin embargo, son pocos los estudios del desarrollo del polen en los que han sido empleados (HESS & HESSE, 1994, TIWARI, 1994, FITZGERALD & KNOX, 1995) dadas las dificultades de su puesta a punto en material vegetal. No cabe duda que este tipo de técnicas serían las de elección en el caso de la inmunolocalización de los alérgenos, al ser capaces de combinar la inmovilización inmediata de los componentes celulares con una adecuada preservación ultraestructural y el mantenimiento de la antigenicidad.

La Tabla 2 resume los trabajos fundamentales existentes hasta la fecha sobre inmunolocalización de alérgenos en el polen. Las diferencias encontradas en la localización de alérgenos pueden corresponder a que se trate de proteínas

diferentes, o a la distinta procedencia de los anticuerpos utilizados. Otra causa de la diversidad en la localización descrita es la divergencia en la interpretación de los resultados, especialmente en los casos en que la preservación ultraestructural es inadecuada.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: LOCALIZACIÓN DE LOS TRANSCRITOS

La mayoría de los estudios realizados sobre alérgenos se han centrado en las propiedades inmunológicas de estas proteínas y en posibles aplicaciones al diagnóstico y/o terapia de las afecciones causadas por éstas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el patrón de expresión de esas proteínas a lo largo del desarrollo de la antera, así como en los diversos tejidos y órganos vegetales. En el caso de *Betula verrucosa*, tanto el alérgeno *Bet v I* como otros alérgenos menores se han extraído de polen, pero no de otros tejidos como hojas o callos. Sin embargo, los RNAs mensajeros correspondientes sí que están presentes en estos tejidos, sugiriendo que estas proteínas capaces de unirse a IgE pueden ser sintetizadas en otros tejidos diferentes del polen (PETTENBURGER & al., 1992). Por otra parte, el estudio del patrón de expresión temporal y espacial de *Bet v I* durante el desarrollo de la inflorescencia de *Betula* indica que dicha expresión se controla a nivel transcripcional, siendo activada únicamente durante las fases tardías de la maduración

de la antera, de forma que es en el polen maduro donde se acumulan esas proteínas en un nivel elevado (SWOBODA & al., 1995). En experimentos de hibridación *in situ*, estos autores han demostrado que los genes *Bet v I* se expresan específicamente en polen bicelular y en polen maduro, sin que se hayan detectado transcritos en tejidos esporofíticos de la antera en ninguno de los estadios del desarrollo. Este patrón de expresión coincide con el de otros genes "tardíos" cuya expresión es activada en estadios finales del desarrollo del polen (MASCARENHAS, 1990).

Estudios preliminares sobre la expresión del alérgeno *Ole e I* han mostrado que los transcritos están presentes en polen maduro, sin que haya podido ser detectada señal alguna en otros tejidos de la hoja, fruto o tallo mediante experimentos de Northern blot (VILLALBA & al., 1994). Una de los datos de interés a confirmar es en qué momento del desarrollo del polen se inicia la expresión de este gen.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS ALÉRGENOS

Las proteínas alérgicas del grano de polen ejercen funciones biológicas hasta ahora desconocidas. Sin embargo, están empezando a obtenerse pruebas que prevén un importante papel de estas proteínas en sucesos clave del desarrollo del polen (TWEEL & al., 1989; HANSON & al., 1989). Quizá la aproxima-

ción más directa a la función/funciones de los alérgenos ha sido la detección de actividad ribonucleásica en el alérgeno mayoritario de *Phleum Pratense* (*Phl p Vb*). En base a esta actividad, se ha atribuido a este alérgeno un importante papel en la relación huésped-patógeno en la planta madre. (BUFE & al., 1995).

El papel biológico de *Ole e I* en el polen del olivo es igualmente desconocido. El alérgeno mayoritario del olivo muestra similitudes en su secuencia con proteínas del polen de especies no relacionadas. Su secuencia aminoacídica presenta entre un 35% y un 40% de identidades con la secuencia deducida de los polipéptidos codificados por los genes LAT52 del polen de tomate, Zmc13 del polen de maíz y OSPSPG del polen de arroz (VILLALBA & al., 1993). Las proteínas codificadas por estos genes tienen un tamaño similar, y contienen un lugar en su secuencia donde potencialmente puede tener lugar N-glicosilación. En su secuencia se repite una región de siete aminoácidos, probablemente implicada en la función biológica de estas proteínas. Igualmente, todas ellas presentan seis residuos de cisteína en posiciones similares, con implicaciones obvias en la consecución de una estructura terciaria similar de estas proteínas. Para obtener datos acerca de la función del producto del gen LAT52, MUCCHIETTI & al., (1994) realizaron experimentos de transformación con LAT52 complementario o "antisense", con el resultado de alteraciones importantes en la hidratación y/o en la germinación del grano de polen. Estos resultados con-

firman la importancia biológica de estas proteínas en estos procesos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A pesar de los grandes avances alcanzados en los últimos años acerca del polen como vector causante de alergias, son muchas las incógnitas que se plantean, y muchas las cuestiones aún abiertas: ¿para qué sirven estas proteínas, además de para causar molestias al hombre?, ¿por qué se expresan en polen y no en otros tejidos?, ¿por qué aumenta anualmente el número de personas sensibilizadas, a pesar de que el agente sensibilizador siempre ha existido?, ¿tienen estas proteínas un papel esencial en la biología del polen?. Si es así, como parece lógico pensar, la eliminación o modificación de estas proteínas mediante ingeniería genética sin alterar dicha función biológica representa un reto difícilmente alcanzable.

Uno de los principales problemas que se presentan en los procedimientos de diagnóstico e inmunoterapia de las alergias al polen es la heterogeneidad de las muestras y extractos proteicos utilizados. En algunos casos, el uso de extractos complejos en inmunoterapia puede dar lugar incluso a la hipersensibilización de los pacientes a constituyentes del polen a los que inicialmente no eran sensibles (MARSH & al., 1972). Las técnicas de purificación que se están desarrollando actualmente incluyen el uso de inmunocromatografía de afinidad, que

emplean anticuerpos monoclonales de elevada especificidad, capaces incluso de discriminar entre isoalergenos (AVJIO-GLU & al., 1994). Otra de las tecnologías con mayores perspectivas para la obtención de cantidades ilimitadas de proteína totalmente homogénea es el uso de métodos recombinantes para la preparación de proteínas (VRTALA & al., 1993; VILLALBA & al., 1994).

El uso de anticuerpos monoclonales está permitiendo el mapeo de los sitios antigénicos en las moléculas de los alérgenos, y el establecimiento de la presencia de determinantes epitópicos comunes en alérgenos distintos, lo cual es de gran utilidad en procedimientos diagnósticos y en el uso de inmunoterapia en pacientes alérgicos (MARTIN-OROZCO, 1994; MARTIN-OROZCO & al., 1994).

Como ya ha sido mencionado anteriormente, los estudios de la expresión génica de los alérgenos en diversos tejidos de la planta, así como a lo largo del desarrollo del polen están siendo realizados únicamente en un número limitado de especies, entre ellas el olivo. Dichos estudios podrían aportar datos de gran importancia para aproximarnos al conocimiento del papel biológico de estas proteínas. Importantes datos sobre dicha función podrían ser obtenidos igualmente mediante represión con la secuencia complementaria a los genes que codifican los alérgenos en plantas transformantes. Lamentablemente, en el caso del olivo y otras especies arbóreas, dicha tecnología tiene actualmente pocas

perspectivas, dada la dificultad de la obtención de transformantes.

A lo largo de esta revisión se ha pretendido destacar que el interés que despierta el polen desde el punto de vista alergénico es doble: médico y biológico. Ambos aspectos por sí solos merecen ser objeto de estudio. Sin embargo ambos son complementarios y sólo con la colaboración y unión de esfuerzos de especialistas en diversos campos científicos (médicos, bioquímicos, biólogos celulares, botánicos...) será posible sumergirnos con éxito en el apasionante estudio de la biología del polen para poder dar respuesta a las cuestiones anteriormente planteadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación obtenida a través de la DIGICYT (Proyecto PB92-0079-CO3-03), DGES (Proyecto PGC PB95-0080) y del programa TMR de la Comisión Europea (FMBI-CT95-0470: "Distribution of allergens and allergen-coding mRNAs in *Olea europaea* L. tissues."), para la realización de gran parte de los resultados obtenidos en el olivo que se mencionan en esta revisión.

BIBLIOGRAFÍA

- AVJIOGLU, A.; HOUGH, T.; SINGH, M. & KNOX, R.B. (1994). Pollen allergens. In: E.G. WILLIAMS; A.E. CLARKE & R.B. KNOX (eds.). **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**, pp. 336-359. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- BALDO, B.A.; PANZANI, R.C.; BASS, D. & ZERBONI, R. (1992). Olive (*Olea Europaea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins. **Mol. Immunol.** 29:1209-1218.
- BATANERO, E.; VILLALBA, M.; LOPEZ-OTIN, C. & RODRIGUEZ, R. (1994a). Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. **Eur. J. Biochem.** 221:187-193.
- BATANERO, E.; VILLALBA, M. & RODRIGUEZ, R. (1994b). Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen: Allergenic implications of the carbohydrate moiety. **Mol. Immunol.** 31:31-37.
- BELIN, L. & ROWLEY, J.R. (1971). Demonstration of birch pollen allergen from isolated pollen grains using immunofluorescence and single radial immunodiffusion technique. **Int. Arch. Allergy** 40:754-769.
- BLANCA, M.; BULTON, P.; BROSTOFF, J. & GONZÁLEZ-REGUERA, I. (1983). Studies of the allergens of *Olea Europaea* pollen. **Clin. Allergy** 13:473-478.
- BREITENEDER, H.; FERREIRA, F.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; EBNER, C.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H. & al., (1993). Four recombinant isoforms of Cor a I, the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. **Eur. J. Biochem.** 212(2):355-362.
- BREITENEDER, H.; FERREIRA, F.; REIKERSTORFER, A.; DUCHENE, M.; VALENTA, R.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. & al., (1992). Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of Aln g I, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). **J. Allergy Clin. Immunol.** 90:909-917.

- BREITENEDER, H.; PETTENBURGER, K.; BITO, A.; VALENTA, R.; KRAFT, D.; RUMPOLD, H. & al., (1989). The gene encoding for major birch allergen Bet v I, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. **EMBO J.** 8:1935-1938.
- BROSTOFF, J. & HALL, T. (1991). Hipersensibilidad: tipo I. In: I.M. ROITT, J. BROSTOFF, D.K. MALE (eds) **Inmunología**. pp. 19.1 Salvat Editores, S.A. Barcelona, 2ª Edic.
- BOUSQUET, J.; GUERIN, B.; HEWITT, B.; LIM, S. & MICHEL, F.B. (1985). Allergy in the Mediterranean area III: Cross-reactivity among Oleaceae pollens. **Allergy** 15:439-448
- BUFE, A.; SCHRAMM, G.; KEOWN, M.B.; SCHLAAK, M. & BECKER, W.M. (1995). Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. **FEBS Lett.** 336:6-12.
- CASAS, C.; MÁRQUEZ, J.; SUÁREZ-CERVERA, M. & SEOANE-CAMBA, J.A. (1996). Immunocytochemical localization of allergenic proteins in *Parietaria judaica* L. (Urticaceae) pollen grains. **Eur. J. Cell. Biol.** 70:179-188.
- CHAPMAN, M.D. (1991). Manipulating allergen genes. **Clin. Exp. Allergy** 21:155-156.
- COSTA, M.A.; COLOMBO, P.; IZZO, V.; KENNEDY, H.; VENTURELLA, S.; COCCHIARA, R.; & al., (1994). cDNA cloning, expression and primary structure of Par j I, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. **FEBS Lett.** 341(2-3):182-186.
- D'AMATO, G. & SPIEKMA, F. TH. M. (1992). European allergenic pollen types. **Aerobiol.** 8:447-450.
- DÉCHAMPS, C. & DEVILLER, P. (1990). Ragweed, a potential plague in Europe. **Allergy & Clin. Immunol. News.** 2:78-83.
- DOLECEK, C.; VRTALA, S.; LAFFER, S.; STEINBERGER, P.; KRAFT, D.; SCHERNER, O. & VALENTA, R. (1993). Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum Pratense*) pollen allergen. **FEBS Lett.** 335(3):299-304.
- FERNÁNDEZ, M.C.; OLMEDILLA, A.; ALCHÉ, J.D.; PALOMINO, P.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. (1996). Immunogold probes for light and electron microscopic localization of *Ole e I* in several Oleaceae pollens. **J. Histochem. Cytochem.** 44(2):151-158.
- FITZGERALD, M.A. & KNOX, R.B. (1995). Initiation of primexine in freeze-substituted microspores of *Brassica campestris*. **Sex. Plant Reprod.** 8:99-104.
- GHOSH, B.; PERRY, M.P.; RAFNAR, T. & MARSH, D.G. (1993). Cloning and expression of immunologically active recombinant Amb a V allergen of short ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen. **J. Immunol.** 150:5391-5399.
- GHOSH, B.; RAFNAR, T.; PERRY, M.P.; BASSOLINO-KLIMAS, D.; METZLER, W.J.; KLAPPER, D.G. & MARSH, D.G. (1994). Immunologic and molecular characterization of Amb p V allergens from *Ambrosia psilostachya* (Western Ragweed) pollen. **J. Immunol.** 152:2882-2889.
- GRIFFITH, I.J.; SMITH, P.M.; POLLOCK, J.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S. & al., (1991). Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic component of rye-grass pollen. **FEBS Lett.** 279:210-215.
- GROTE, M. (1988). Binding of antibodies against birch pollen antigens/allergens to various parts of apples as studied by immunogold electron microscopy. **Immunobiol.** 176:290-300.
- GROTE, M. (1991). Immunogold electron microscopy of soluble proteins: localization of Bet v I major allergen in ultra-thin sections of birch pollen after anhydrous fixation

- techniques. **J. Histochem. Cytochem.** 39(10):1395-1401.
- GROTE, M. (1992). Ultrastructural morphology and allergen detection in birch pollen after aqueous, anhydrous-liquid, and vapor fixation techniques. **Microscopy Res. and Tech.** 21:242-248.
- GROTE, M.; DOLECEK, CH.; VAN REE, R. & VALENTA, R. (1994). Immunogold electron microscopic localization of Timothy Grass (*Phleum Pratense*) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. **J. Histochem. Cytochem.** 42(3):427-431.
- GROTE, M. & FROMME, H.G. (1986). Cross-reactivity of birch anthers and leaves with birch pollen antigens and allergens. A fine-structural immunocytochemical study using the post-embedding protein-A-gold technique. **J. Histochem. Cytochem.** 11:1459-1464.
- HANSON, D.D.; HAMILTON, D.A.; TRAVIS, J.L.; BASHE, D.M. & MASCARENHAS, J.P. (1989). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. **The Plant Cell** 1:173-179.
- HESS, M.W. & HESSE, M. (1994). Ultrastructural observations on anther tapetum development in freeze fixed *Ledebouria socialis* (Hyacinthaceae). **Planta** 192:421-430.
- HORMAZA, J.I. & HERRERO, M. (1995). El polen como individuo interactivo. **Polen** 7:5-18.
- HOWLETT, B.J.; VITHANAGE, H.I.M.V. & KNOX, R.B. (1981). Immunofluorescent localization of two water-soluble glycoproteins including the major allergen from the pollen ryegrass, *Lolium perenne*. **Histochem. J.** 13:461-480.
- IPSEN, H. & HANSEN, O.C. (1990). Structural similarities among major allergens of tree pollens. In: A.H. SEHON, D. KRAFT & G. KUNKEL (eds). **Epitopes of Atopic Allergens**. pp. 3. UCB Institute of Allergy, Brussels.
- IPSEN, H. & HANSEN, O.C. (1991). The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g I, birch (*Betula Verrucosa*) Bet v I, hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b I, and oak (*Quercus alba*) Que a I pollens. **Mol. Immunol.** 28:1279-1288.
- KING, T.P. (1979). Immunochemical properties of some atopic allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.** 64:159.
- KENERMAN, S.M.; McCULLOUGH, J.; GREEN, J. & OWNBLY, D.R. (1992). Evidence of cross-reactivity between olive, ash, privet and Russian olive tree pollen allergens. **Ann. Allergy** 69:493-496.
- KNOX, R.B. (1984). The pollen Grain. In: B.M. JOHRI (ed). **Embryology of Angiosperms**, pp. 197-271. Springer-Verlag, Berlin.
- KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, J. & REED. (1970). Localization of antigens associated with the pollen grain wall by immunofluorescence. **Nature** 225:1066-1068.
- KNOX, R.B.; VITHANAGE, H.I.M. & HOWLETT, B.J. (1980). Botanical immunocytochemistry: a review with special reference to pollen antigens and allergens. **Histochem. J.** 12:247-272.
- KOMIYAMA, N.; SONE, T.; SHIMIZU, K.; MORIKUBO, K. & KINO, K. (1994). cDNA cloning and expression of Cry j II the second major allergen of Japanese cedar pollen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 201(2): 1021-1028.
- LARSEN, J.N.; STROMAN, P. & IPSEN, H. (1992). PCR based cloning and sequencing of isogenes encoding the tree pollen major

- allergen Carb I from *Carpinus betulus*, hornbeam. **Mol. Immunol.** 29(6):703-711.
- LAUZURICA, P.; GURBINDO, C.; MARURI, N.; GALOCHA, B.; DÍAZ, R.; GONZÁLEZ, J.; GARCÍA, R. & LAHOZ, C. (1988a). Olive (*Olea Europaea*) pollen allergens. I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. **Mol. Immunol.** 25:329-335.
- LAUZURICA, P.; MARURI, N.; GALOCHA, B.; GONZÁLEZ, J.; DÍAZ, R.; PALOMINO, P.; HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, R. & LAHOZ, C. (1988b). Olive (*Olea Europaea*) pollen allergens. II. Isolation and characterization of two major antigens. **Mol. Immunol.** 25:337-344.
- LOMBARDERO, M.; BARBAS, J.A.; MOSCO-SO DEL PRADO, J. & CARREIRA, J. (1994). cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e I*. **Clin. Exp. Allergy** 24:765-770.
- MARSH, D.G.; GOODFRIEND, L.; KING, T.P.; LWENSTEIN, H. & PLATTS-MILLS, T.A.E. (1987). Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol.** 80:639-645.
- MARSH, D.G.; LICHTENSTEIN, L.M. & CAMPBELL, D.H. (1972). Induction of IgE-mediated immediate hypersensitivity to Group I_k grass pollen allergen and allergoids in non-allergic man. **Immunol.** 22:1013-1028
- MARTÍN-OROZCO, E. (1994). **Alergeno principal del polen del olivo "Ole e I": mapeo epitópico, localización ultraestructural y reactividad cruzada con otros pólenes"**. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- MARTÍN-OROZCO, E.; CÁRDABA, B.; DEL POZO, V.; DE ANDRÉS, B.; VILLALBA, M.; GALLARDO, S.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I.; FERNÁNDEZ, M.C.; ALCHÉ, J.D.; RODRÍGUEZ, R.; PALOMINO, P. & LAHOZ, C. (1994). *Ole e I*: Epitope mapping, Cross-Reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 104:160-170.
- MASCARENHAS, J.P. (1990). Gene activity during pollen development. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 41:317-338.
- MIKI-HIROSIGE, H.; NAKAMURA, YASUEDA, H.; SHIDA, T. & TAKAHASHI, Y. (1994). Immunocytochemical localization of the allergenic proteins in the pollen of *Cryptomeria japonica*. **Sex. Plant Reprod.** 7:95-100.
- MUSCHIETTI, J.; DIRCKS, L.; VANCANNEYT, G. & McCORMICK, Sh. (1994). LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. **Plant J.** 6(3):321-338.
- OBISPO, T.M.; MELERO, J.A.; CARPIZO, J.A., CARREIRO, J. & LOMBARDERO, M. (1993). The main allergen of *Olea Europaea* (*Ole e I*) is also present in other species of the Oleaceae family. **Clin. Exp. Allergy** 23:311-316.
- PACINI, E. (1990). Role of pollen in plant physiology and reproduction. In: P. FALAGIANI (Ed.). **Pollinosis**, pp. 3-18. CRC Press, Boca Raton, FL.
- PEREZ, M.; ISHIOKA, G.Y.; WALKER, L.E. & CHESNUT, R.W. (1990). cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. **J. Biol. Chem.** 265(27):16210-16215.
- PETERSEN, A.; BUFE, A.; SCHRAMM, G.; SCHLAAK, M. & BECKER, W.M. (1995). Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phl p VI). II. cDNA cloning of Phl p VI and structural comparison to grass group V. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 108(1):55-59.
- PETTENBURGER, K.; TEJKE, M.; VALENTA, R.; HOFFMAN-SOMMERGRUBER,

- K.; SWOBODA, I.; HEBERLE-BORS, E.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1992). Distribution of allergens and allergen-coding mRNAs in various tissues of white birch. **Mol. Immunol.** 29(11):1401-1406.
- RAFAR, T.; GRIFFITH, I.J.; KUO, M.; BOND, J.F.; ROGERS, B.L. & KLAPPER, D.G. (1991). Cloning of Amb a I (Antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. **J. Biol. Chem.** 266:1229-1236.
- RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; FERNANDEZ, M.C. & ALCHE, J.D. (1995a). Immunocytochemical localization of allergenic protein (*Ole e I*) in the endoplasmic reticulum of the developing pollen grain of olive (*Olea Europaea* L.). **Planta** 196:558-563.
- RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; FERNANDEZ, M.C.; ALCHE, J.D. & OLMEDILLA, A. (1995b). Endoplasmic reticulum as a storage site for allergenic proteins in pollen grains of several Oleaceae. **Protoplasma** 187:111-116.
- ROHAC, M.; BIRKNER, T.; REIMITZER, Y.; BOHLE, B.; STEINER, R.; BREITENBACH, M. & al., (1991). The immunological relationship of epitopes on major tree pollen allergens. **Mol. Immunol.** 28:897.
- ROGERS, B.L.; MORGENSTERN, J.P.; GRIFFITH, I.J.; YU, X.-B.; COUNSELL, C.M.; BRAUER, A.W. & al., (1991). Complete sequence of the allergen Amb a II. Recombinant expression and reactivity with T cells from ragweed allergic patients. **J. Immunol.** 147:2547-2552.
- ROOS, N. & MORGAN, A.J. (1990). **Cryopreparation of Thin Biological Specimens for Electron Microscopy: Methods and Applications.** Oxford Univ.Press-Royal Microscopical Society.
- SEIBERLER, S.; SCHEINER, O.; KRAFT, D.; LONSDALE, D. & VALENTA, R. (1994). Characterization of a birch pollen allergen, Bet v III, representing a novel class of Ca²⁺ binding proteins: specific expression in maturing pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca²⁺. **EMBO J.** 13(15):3481-3486.
- SILVANOVICH, A.; ASTWOOD, J.; ZHANG, L.; OLSEN, E.; KISIL, F.; SEHON, A.; MOHAPATRA, S. & HILL, R. (1991). Nucleotide sequence analysis of three cDNAs coding for Poa p IX isoallergens of Kentucky bluegrass pollen. **J. Biol. Chem.** 266(2):1204-1210.
- SINGH, M.B.; HOUGH, T.; THEERAKULPISUT, P.; AVJIOGLU, A.; DAVIES, S.; SMITH, P.M. & al., (1991). Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. **PNAS** 88:1384-1388.
- SONE, T.; KOMIYAMA, M.; SHIMIZU, K.; KUSAKABE, T.; MORIKUBO, K. & KINO, K. (1994). Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 199(2):619-625.
- STAFF, I.A.; TAYLOR, P.E.; SMITH, P.; SINGH, M.B. & KNOX, R.B. (1990). Cellular localization of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. **Histochem. J.** 22:276-290.
- SUZUKI, M.; KOMIYAMA, N.; ITOH, M.; SONE, T.; KINO, K.; TAKAGI, Y. & OHTA, N. (1996). Purification, characterization and molecular cloning of Cha o I, a major allergen of *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. **Mol. Immunol.** 33:451-460.
- SWOBODA, I.; DANG, T.C.H.; HEBERLE-BORS, E. & VICENTE, O. (1995). Expression of Bet v I, the major birch pollen allergen, during anther development. An in situ hybridization study. **Protoplasma** 187:103-110.

- SWOBODA, I.; JILEK, A.; FERREIRA, F.; ENGEL, E.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; SCHEINER, O. & al., (1995). Isoforms of Bet v I, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. **J. Biol. Chem.** 270(6):2607-2613.
- TAKAHASHI, Y.; MIZOGUCHI, J. & KATAGIRI, S. (1989). Development and distribution of the major pollen allergen (Cry j I) in male flower buds of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). **Jpn. J. Allergol.** 38(12): 1354-1358.
- THOMMEN, A.A. (1931). Hay fever. In: A.F. COCA, M. WALZER & A.A. THOMMEN (eds). **Asthma and hay fever**, pp. Y11. Thomas. Springfield.
- TIWARI, S.C. (1994). An intermediate-voltage electron microscopic study of freeze-substituted generative cell in pear (*Pyrus communis* L.): features with relevance to cell-cell communication between the two cells of a germinating pollen. **Sex. Plant Reprod.** 7:177-186.
- TOVEY, E.R. & BALDO, B.A. (1987). Characterisation of allergens by protein blotting. **Electrophoresis** 8:452-463.
- TWELL, D.; WING, R.; YAMAGUCHI, J. & McCORMIK, S. (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene for tomato. **Mol. Gen. Genet.** 217:240-245.
- VALENTA, R.; DUCHÈNE, M.; PETTENBURGER, K.; SILLABER, C.; VALENT, P.; BETTELHEIM, P.; BREITENBACH, M.; RUMPOLD, H.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. **Science** 253:557-559.
- VALENTA, R.; DUCHÈNE, M.; EBNER, C.; VALENT, P.; SILLABER, C.; DEVILLER, P.; FERREIRA, F.; TEJKA, M.; EDELMANN, H.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. **J. Exp. Med.** 175:337-385.
- VALENTA, R.; FERREIRA, F.; GROTE, M.; SWOBODA, Y.; VRTALA, S.; DUCHÈNE, M.; DEVILLER, P.; MEAGHER, R.B.; MCKINNEY, E.; HEBERLE-BORS, E.; KRAFT, D. & SCHEINER, O. (1993). Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. **J. Biol. Chem.** 268:22777-22781.
- van REE, R.; VOITENKO, V.; van LEEUWEN, W.A. & AALBERSE, R.C. (1992). Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 98:97-104.
- VELA, C.; PLATAS, C.; GURBINDO, C.; TRICAS, L.; SUBIZA, E.; GARCÍA, R. & LAHOZ, C. (1982). Fractionation and biological characterization of *Olea Europaea* pollen extract. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 68:289-294.
- VILLALBA, M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; MARTÍN-OROZCO, E.; MONSALVE, R.I.; PALOMINO, P.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1990). Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea Europaea* pollen and N-terminal amino acid sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 172:523-528.
- VILLALBA, M.; BATANERO, E.; LÓPEZ-OTÍN, C.; SÁNCHEZ, L.M.; MONSALVE, R.I.; GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M.A.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1993). The amino acid sequence of *Ole e I*, the major allergen from olive tree (*Olea Europaea*) pollen. **Eur. J. Biochem.** 216:863-869.
- VILLALBA, M.; BATANERO, E.; MONSALVE, R.I.; GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M.A.; LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1994). Cloning and Expression of *Ole e I*, the major allergen from olive tree pollen. **J. Biol. Chem.** 269(21):15217-15222.

VRTALA, S.; SPERR, W.R.; REIMITZER, Y.;
van REE, R.; LAFFER, S.; MÜLLER, W.-D.;
VALENT, P.; LECHNER, K.; RUMPOLD,
H.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. & VALEN-
TA, R. (1993). cDNA cloning of a major
allergen from timothy grass (*Phleum
Pratense*) pollen; characterization of the

recombinant Phl p V allergen. **J. Immunol.**
151:4773-4781.

WHEELER, A.W.; HICKMAN, B.E. & FOX, B.
(1990). Heterogeneity of a major allergen
from olive (*Olea europea*) pollen. **Mol.
Immunol.** 27:631-636