

## STUDIO PRELIMINARE DELLE CARATTERISTICHE FUNZIONALI E ALLERGENICHE DI CASEINA A1A1 E A2A2 IN LATTE BOVINO

**Sommario:** 1. *Introduzione.* – 2. *Proteine e varianti genetiche di latte bovino.* – 3. *Allergie al latte vaccino.* – 4. *Materiali e metodi.* – 5. *Differenze qualitative e quantitative del latte A1A1 vs A2A2.* – 6. *Differenze di immunoreattività tra varianti A1A1 vs A2A2.* – 7. *Conclusione.*

### 1. **Introduzione.**

Uno degli alimenti più discussi in materia alimentare è sicuramente il latte: prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa della mammella di animali in buono stato di salute e nutrizione; costituito principalmente da acqua, lipidi, proteine, glucidi, sali minerali e vitamine.

La funzione naturale del latte è quella di essere l'alimento esclusivo di cui si nutrono i mammiferi dalla nascita fino ai primi anni di vita, fase in cui la crescita è rapida e non possono essere utilizzati altri alimenti sostitutivi.

Nonostante da solo non riesca a coprire tutto il fabbisogno energetico dell'uomo adulto, il latte risulta essere anche per lui un ottimo alimento. Il suo eccellente valore nutrizionale è comprovato da millenni di costante impiego nell'alimentazione umana.<sup>1</sup>

Negli ultimi anni sono stati pubblicati studi sulle diverse isoforme proteiche del latte vaccino, in particolare sulla variante A2A2 che sembrerebbe essere correlata a minori disturbi in ambito cardiopatico, neurologico, diabetico, nello sviluppo del sistema immunitario del bambino, oltre ad avere una correlazione negativa con determinate allergie e intolleranze.<sup>2-3</sup>

<sup>1</sup> Cfr. C. ALAIS, *Scienza del latte*, Milano, Tecniche nuove, 2000.

<sup>2</sup> Cfr. I. DE NONI et al., Review del potenziale effetto sulla salute delle  $\beta$ -

Uno studio del 2020 riporta che il consumo di latte contenente solo  $\beta$ -caseina A2A2 è associato a un minor numero di sintomi gastrointestinali rispetto al consumo di latte convenzionale nei maldigestori di lattosio. Gli effetti potrebbero essere mediati dal peptide oppioide b-casomorfine7 (BCM-7) che si forma dopo l'ingestione di latte con  $\beta$ -caseina A1.<sup>4</sup>

Per dare un contributo alla ricerca, ci siamo occupati mediante tecniche di proteomica, (elettroforesi 1D e 2D) della caratterizzazione qualitativo-molecolare della frazione proteica  $\beta$ -caseinica del latte A2A2, confrontandola con la variante A1A1.

I campioni di latte con  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2 utilizzati nel presente studio, sono stati prelevati da singoli animali provenienti da un allevamento con 150 bovine selezionate per la caseina A2A2, su un totale di allevamento di 200 animali.

Inoltre, viste le possibili implicazioni biologiche e le differenti modificazioni che tali isoforme possono subire durante la fase digestiva, visto anche che sempre più frequentemente vengono segnalate sindromi di intolleranza/allergia al latte, con conseguente sostituzione nei bambini del latte con “latte” vegetali, ci siamo indirizzati allo studio della possibile differente allergenicità dei due tipi di latte, A1A1 e A2A2, applicando tecniche di immunoproteomica (immunoblot 1D e 2D).

casomorfine e dei peptidi correlati, 1° Report del DATEX Working Group sulle  $\beta$ -casomorfine Componenti del Gruppo di Lavoro, in *EFSA Scientific Report* vol. 231, 2009.

<sup>3</sup> Cfr. S. JIANQIN et al. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk, in *Nutr. J.*, 15, 35, 2016.

<sup>4</sup> Cfr. M. RAMAKRISHNAN, T.K. EATON, O.M. SERMET, D.A. SAVAIANO, Milk Containing A2  $\beta$ -Casein ONLY, as a Single Meal, Causes Fewer Symptoms of Lactose Intolerance than Milk Containing A1 and A2  $\beta$ -Caseins in Subjects with Lactose Maldigestion and Intolerance: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial, in *Nutrients*, 2020, 17;12(12):3855. doi: 10.3390/nu12123855. PMID: 33348621; PMCID: PMC7766938.

## 2. Proteine e varianti genetiche di latte bovino.

Il contenuto proteico del latte è caratterizzato da diversi tipi di proteine. Il 25% è costituito da siero-proteine e costituenti azotati non proteici (NPN) e la restante parte da caseine, le proteine più importanti nel processo di caseificazione. Le caseine a loro volta si dividono in altre 5 frazioni, tra cui la  $\beta$ -caseina che rappresenta circa il 36% della caseina totale. Le proteine in quanto tali, sono costituite da una catena di amminoacidi (229 nel caso della  $\beta$ -caseina) codificati da una sequenza di DNA. In natura, come per qualsiasi proteina, si possono trovare più varianti genetiche, che differiscono tra loro per la sostituzione anche solo di 1 o 2 amminoacidi, differenze che derivano da mutazioni del DNA nel corso di migliaia di anni di selezione.<sup>5</sup> La variante originale della  $\beta$ -caseina sembra essere l'A2A2 che a seguito di una mutazione verificatasi circa 5000 anni fa, ha portato ad avere la presenza nella popolazione bovina della variante A1A1. Quest'ultima nel corso della selezione animale, indirizzata soprattutto verso caratteri produttivi, è diventata quella prevalente, soprattutto nella razza Frisona. La differenza tra le due varianti sta nella presenza in posizione 67 della catena, dell'amminoacido Istidina nel caso della A1A1 e Prolina nella A2A2.<sup>5</sup>

Pertanto, nel latte dei bovini allevati nei Paesi occidentali, le varianti genetiche più frequenti della  $\beta$ -caseina, sono la  $\beta$ -caseina A1A1 (BCA1) e la  $\beta$ -caseina A2A2 (BCA2). Negli ultimi anni, alcuni studi hanno evidenziato che la variante della  $\beta$ -caseina A2A2 sembrerebbe essere correlata a minori disturbi in ambito cardiopatico, diabetico, nello sviluppo del sistema immunitario del bambino, oltre ad avere una correlazione negativa con determinate allergie e intolleranze. Tutto ciò ha stimolato l'interesse di alcune cooperative e allevatori, che hanno introdotto l'allevamento di

<sup>5</sup> Cfr. P. CREMONESI *et al.*, Le varianti A1 e A2 della beta caseina non hanno un effetto significativo sul microbiota, in *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 2020, 70, pp. 26-31.

razze bovine geneticamente selezionate per la produzione di latte A2A2.

Queste due varianti genetiche, come già detto, si differenziano per un solo aminoacido, l'istidina-67 per A1A1 e la prolina-67 per A2A2. La differenza di questo aminoacido nelle due isoforme di  $\beta$ -caseina può modificare il taglio molecolare operato dagli enzimi digestivi e quindi dare luogo a polipeptidi con differenti caratteristiche biologiche.

In particolare, la variante A1 della  $\beta$ -caseina può essere idrolizzata dall'enzima dipeptil peptidasi IV (DPP IV)<sup>6</sup>, a livello del legame peptidico tra i residui 66-67 (Ile66-His67), determinando il rilascio del peptide oppioide conosciuto come  $\beta$ -casomorfina-7 (BCM7). Viceversa, la presenza di un residuo di prolina in posizione 67 nella variante A2 della  $\beta$ -caseina, conferisce resistenza all'idrolisi enzimatica da parte delle protesi gastro-intestinali producendo livelli minimi di BCM-7. Infatti, i risultati estrapolati da uno studio riportano un valore di 1,85 mg di BCM-7 per g di  $\beta$ -caseina A1A1 e 0,01 mg per g di  $\beta$ -caseina A2A2.<sup>7</sup>

Le BCM-7 hanno alta affinità con i siti di legame dei recettori  $\mu$ -oppioidi e questo accade a causa della presenza di un residuo di tirosina (Tyr) presente nel terminale amminico della sequenza aminoacidica e dalla presenza di un ulteriore residuo aromatico (in genere fenilalanina, Phe) in terza posizione. Questi peptidi mostrano attività oppioidi, immuno-regolatorie e citomodulatorie attraverso la loro interazione con i  $\mu$ -recettori localizzati nel sistema nervoso centrale, nel tratto gastrointestinale e in alcune cellule del sistema immunitario.<sup>8</sup>

<sup>6</sup> Cfr. E. FIEDOROWICZ *et al.*,  $\beta$ -casomorphin-7 alters  $\mu$ -opioid receptor and dipeptidyl peptidase IV genes expression in children with atopic dermatitis, in *Peptides*, 2014, 62, pp. 144-149.

<sup>7</sup> Cfr. D. D. NGUYEN, S.K. JOHNSON, F. Buseti, A. SOLAH, Formation and Degradation of Beta-casomorphins in Dairy Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, 55, pp. 1955-1967.

<sup>8</sup> Cfr. M.R. UL HAQ, R. KAPILA, R. SHARMA, V. SALIGANTI, S. KAPILA, Comparative evaluation of cow  $\beta$ -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-

Studi epidemiologici hanno riscontrato esserci una forte correlazione tra l'assunzione di alte concentrazioni di  $\beta$ -caseina di tipo A1 e l'incidenza di patologie.

Tuttavia, l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ancora non riconosce rilevanza a tali studi, in quanto non sono presenti dati sufficienti a causa dell'eseguità delle ricerche; in effetti gli allevamenti che hanno iniziato tale tipo di selezione sono molto pochi, pertanto anche gli studi necessitano di ulteriori verifiche e conferme (*"Based on the present review of available scientific literature, a cause-effect relationship between the oral intake of BCM7 or related peptides and aetiology or course of any suggested non-communicable diseases cannot be established. Consequently, a formal EFSA risk assessment of food-derived peptides is not recommended"*).

### **3. Allergie al latte vaccino.**

Le proteine presenti nel latte vaccino sono responsabili di alcune delle più comuni allergie alimentari.

L'allergia alle proteine del latte vaccino (CMPA) è l'allergia alimentare più frequente nei bambini di età inferiore a 1 anno e tende a scomparire con l'aumentare dell'età. Deriva da una risposta immunitaria disadattiva (mediata da IgE, non mediata da IgE o mista) contro le proteine del latte vaccino (CMP).

Il termine *allergia* si riferisce esclusivamente a reazioni avverse che coinvolgono meccanismi immunitari e deve essere distinto, sia dalle intolleranze, dovute a meccanismi enzimatici, farmacologici o idiopatici, che dalle reazioni avverse tossiche. Da un punto di vista clinico, le reazioni mediate dalle IgE sono caratterizzate dall'insorgenza acuta di una risposta prevalentemente cutanea o respiratoria associata alla presenza di anticorpi IgE specifici. Le

mediated inflammatory response in mouse gut., in *Eur J Nutr.* 2014, Jun;53(4) pp. 1039-49. doi: 10.1007/s00394-013-0606-7. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24166511.

reazioni che non sono mediate dalle IgE di solito derivano da risposte immunitarie cellulari.<sup>9</sup>

Uno degli obiettivi del nostro lavoro è stato proprio quello di studiare le eventuali diverse caratteristiche allergeniche del latte bovino con  $\beta$ -caseina A2A2 confrontato con latte contenente  $\beta$ -caseina A1A1 in 5 soggetti pediatrici poliallergici di età compresa tra 6 e 12 anni. Lo scopo è stato quello di evidenziare con tecniche di immunoproteomica le differenze e la reattività immunologica delle varie componenti dei due tipi di latte analizzati (A1 e A2).

#### 4. Materiali e Metodi.

I campioni di latte con  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2 utilizzati nel presente studio, sono stati prelevati da animali sani (con assenza di fenomeni infiammatori e/o patologie in corso), di razza Frisona con circa 110 giorni di lattazione, separati in gruppi selezionati per la  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2, presso la Cascina Cigolina (Società Agricola Eredi Vittorio Gaboardi S.S. LO).

Contemporaneamente, dall'Ospedale Fatebenefratelli e Oftalmico di Milano, sono stati reclutati 5 soggetti pediatrici poliallergici e 5 non, selezionati in base ai criteri di inclusione ed esclusione riportati nei documenti approvati dal Comitato Etico (ver.3/protocollo dal titolo "Valutazione delle caratteristiche funzionali e allergeniche di latte bovino con  $\beta$ -caseina nelle varianti A1A1 vs A2A2"). Per ciascun paziente sono stati prelevati 3 ml di sangue in provette BD *Vacutainer Serum Separation Tubes* (SST), successivamente lasciati coagulare a temperatura ambiente e poi centrifugati per permettere al gel di separare la parte corpuscolata dal siero.

<sup>9</sup> Cfr. B. ESPÍN JAIME *et al.*, Non-IgE-mediated cow's milk allergy: Consensus document of the Spanish Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (SEGHNP), the Spanish Association of Paediatric Primary Care (AEPAP), the Spanish Society of Extra-hospital Paedia. in *An. Pediatria*, 2019, English Ed. 90, pp. 193 -193.

### **Analisi proteomica.**

#### **Frazionamento delle componenti del latte.**

I campioni di latte crudo intero, sono stati inizialmente scremati mediante centrifugazione per eliminare la parte lipidica che avrebbe potuto interferire con le seguenti fasi analitiche e successivamente pastorizzati al fine di ottenere un latte fresco di alta qualità.

Ai campioni scremati e pastorizzati, sono stati aggiunti 30 ml di acido acetico al 33,3% e poi 30 ml di acetato di sodio 3.3M per la precipitazione isoelettrica delle caseine a pH 4.6. Il precipitato costituito da tutte le caseine è stato quindi separato dalla fase acquosa mediante centrifugazione. Le caseine così ottenute sono state lavate con acqua bidistillata. Il precipitato e il surnatante sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

#### **Solubilizzazione e dosaggio.**

Prima del dosaggio proteico, le varie frazioni proteiche (sieroproteine e caseine) sono state solubilizzate con buffer UTC4 (composto da: urea 7M, tiourea 2M e 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate - (CHAPS) al 4%) e sonicate a 20°C a bagnomaria fino a completa dissoluzione. La quantificazione delle proteine è stata effettuata mediante il metodo Bradford modificato (Bio-Rad protein assay) con lettura allo spettrofotometro a 595nm (GeneQuant 100, GeneQuant GE Healthcare).

#### **Elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE).**

Al fine di valutare in maniera preliminare il profilo proteico dei campioni in esame è stata effettuata un'elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE).

Per effettuare la separazione delle proteine mediante SDS-PAGE, i campioni sono stati diluiti in 2x Laemmli Sample Buffer. Una volta assemblato il modulo di elettroforesi si procede aggiungendo l'Electrode (running) buffer 1. A questo punto è possibile caricare i campioni all'interno dei pozzetti, caricando nel primo pozzetto il marker (precision plus con range 250-10 KDa) e in quelli a seguire i campioni.

Inizialmente per permettere alle proteine di allinearsi lungo lo stacking gel si imposta un voltaggio iniziale di 50V; dopo 15 minuti il voltaggio viene incrementato a 200V totali per procedere con la separazione in base al peso molecolare. A fine corsa si procede ad effettuare lavaggi del gel con acqua bidistillata e successivamente ad incubarlo con 100ml di una soluzione contenente Blue Coomassie G250 per tutta la notte<sup>10</sup>.

### **Elettroforesi bidimensionale (2-DE).**

Questa metodica prevede la separazione delle proteine in due dimensioni: isoelettrofocalizzazione e SDS-PAGE.

Per la prima dimensione (isoelettrofocalizzazione) sono state utilizzate delle strip di 7 cm con un pH di 4-7. Le strip inizialmente disidratate sono state reidratate con 125 µg di proteine diluite in 125 ml di soluzione di reidratazione composta da Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DL-Dithiothreitol 65mM e IPG buffer 4-7 allo 0,5%.

A questo punto le strip vengono reidratate in maniera attiva a 50V per 16h a 20°C utilizzando il sistema Protean IEF Cell (Biorad). Si procede aumentando gradualmente i voltaggi fino al valore finale desiderato per avere un focusing ottimale.

<sup>10</sup> Cfr. P. Roncada et al., Farm animal milk proteomics, in *Journal of Proteomics*, 2012, vol. 75, pp. 4259-4274; C. PIRAS, P. RONCADA, P.M. RODRIGUES, L. BONIZZI, A. SOGGIU, Proteomics in food: Quality, safety, microbes, and allergens, in *Proteomics*, 2016, vol. 16, pp. 799-815; A. SOGGIU, P. RONCADA, C. PIRAS, *Proteomics in Milk and Dairy Products*, in A. DE ALMEIDA, D. ECKERSALL, I. MILLER (eds.) *Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology*, Cham., Springer, 2018, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69682-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69682-9_9).



Prima di procedere con la separazione mediante SDS-PAGE (seconda dimensione), le strip sono state equilibrate in due passaggi da 15 minuti con una soluzione di equilibratura (6M urea, 2%SDS, Tris HCL50 mM, pH 8.8, 30% glicerolo) a cui vengono aggiunti rispettivamente 1% DTT nel primo step e 2,5% iodoacetammide nel secondo.

A questo punto è stata posizionata la strip sul gel di acrilammile al 12% e ricoperta da una soluzione di agarosio *low melting point* allo 0,5% contenente blu di bromofenolo allo 0,002% che servirà da tracciante della corsa.

Il marker di peso molecolare (Precision Plus dual xtra, Biorad) viene pipettato su un pezzo di carta filtro in quantità pari a 8 microlitri e poi posizionato al fianco della strip (catodo).

La seconda dimensione è poi stata effettuata su un sistema protean mini tetra (Biorad) utilizzando i seguenti parametri: 50V 15', 200V fino ad arrivo del tracciante alla fine del gel. Una volta terminata la seconda dimensione i gel possono essere colorati oppure utilizzati per il trasferimento su membrana.<sup>10 11</sup>

### **Analisi immunoproteomica.**

#### **Western blot.**

Una volta separate in seconda dimensione, le proteine sono state trasferite dal gel di acrilamide su una membrana di polivinilidenefluoruro da 0,45ml a bassa fluorescenza (LF-PVDF) utilizzando il sistema Trans-blot turbo (Biorad).

Per verificare il corretto trasferimento la membrana viene colorata con una soluzione di Ponceau S allo 0,5% per 5 min e l'immagine acquisita verificata al densitometro. Successivamente la membrana è stata sottoposta a decolorazione con 2 lavaggi da 5' di acqua ultrapura e 2 lavaggi da 5' con tris buffered saline 1x 0,1% Tween 20 (TBST).

Per bloccare le interazioni aspecifiche degli anticorpi si effettua quindi la saturazione della membrana con BSA al 3% in TBST (BSA3%-TBST).

Le membrane così trattate sono state incubate con il siero dei pazienti (1:100) diluito in BSA3%-TBST per 2h e poi lavate con TBST. A questo punto sono state incubate con goat anti-human-IgE per 1h e successivamente sono stati effettuati nuovamente lavaggi con TBST. Come ultimo passaggio è stato utilizzato un anticorpo anti-goat coniugato con perossidasi (anti-goat Ig totali-HRP) alla diluizione di 1:10000 in BSA3% -TBST.

Le proteine immunoreattive sono state rivelate mediante incubazione della membrana con il reagente ECL (ECL Prime, GE Healthcare) e successiva acquisizione del segnale chemiluminescente mediante CCD scanner<sup>11</sup>.

#### **Acquisizione e analisi delle immagini.**

Per l'acquisizione dei gel è stato utilizzato un densitometro calibrato (ImageScanner III, GE Healthcare, Uppsala). Le variazioni nell'espressione di proteine sono state analizzate utilizzando il software Progenesis SameSpots (totalab, UK), Versione 4.6.

Per l'acquisizione dei marker di peso molecolare fluorescenti delle membrane è stato utilizzato uno scanner laser (Pharos FX, BIO-RAD), controllato dal software Quantity One 4.6.3.

Per l'acquisizione dei western blot è stato utilizzato il sistema dotato di scanner CCD (C-Digit LiCor). Per la gestione e l'esportazione delle immagini acquisite è stato utilizzato il software Image Studio 5 (Li-COR) e il software FIJI – ImageJ per la sovrapposizione dei vari canali acquisiti<sup>12</sup>.

<sup>11</sup> Cfr. nota prec.

<sup>12</sup> Cfr. not. prec.

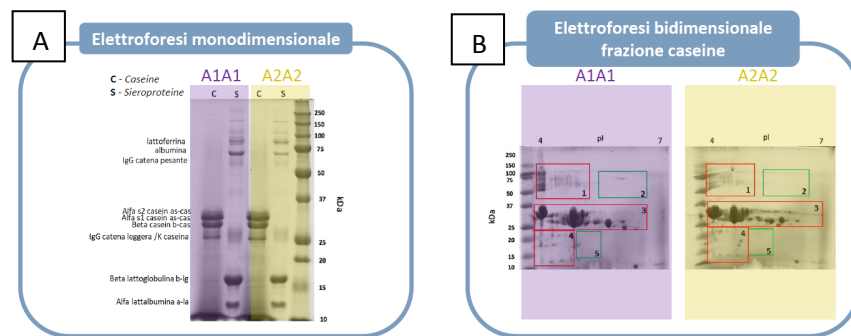
## 5. Differenze qualitative e quantitative del latte A1A1 vs A2A2.

Dal momento che le conoscenze sulle reali caratteristiche delle due isoforme proteiche sono molto poche, ci siamo *in primis* occupati, mediante analisi di tipo proteomico, di verificare le differenze di espressione proteica tra il latte con  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2.

Innanzitutto, i campioni di latte con  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2 utilizzati nel presente studio, sono stati prelevati presso la Cascina Cigolina (Società Agricola Eredi Vittorio Gaboardi S.S. LO), dove le bovine di razza Frisona sono separate in gruppi geneticamente selezionati per la  $\beta$ -caseina: A1A1 e A2A2.

Il profilo elettroforetico monodimensionale di latte A2A2 non presenta sostanziali differenze di tipo quali-quantitativo rispetto al latte A1A1, perché la tecnica utilizzata, pur essendo sensibile, non permette la separazione in base al punto isoelettrico (pI). (Fig. 1.A). Al contrario, nelle analisi bidimensionali sono visibili alcune differenze tra le due varianti (Fig. 1.B), confermate dall'analisi d'immagine del gel 2D. (Fig. 2). In particolare nella Fig. 1.B è riportata l'immagine rappresentativa dei gel 2D di latte con  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2 non frazionato nelle componenti di caseine e sieroproteine. L'area indicata con 1 rappresenta una zona a peso molecolare (MW) tra 50 e 100 kDa e tra 4 e 5 di punto isoelettrico (pI). Le proteine appartenenti a questa area sono principalmente, in base ai parametri di MW e pI, addotti/dimeri di diversi tipi di caseine originatesi probabilmente nella fase di pastorizzazione. L'area 2 contiene al suo interno principalmente diverse isoforme di proteine del siero (albumina e immunoglobuline) prevalentemente in condizioni di monomero. L'area 3 risulta per l'abbondanza di molteplici isoforme caseiniche associate alle allergie (alfa s2, s1, beta e kappa) quella più complessa e dove si riscontrano le maggiori differenze sia qualitative che quantitative tra i due campioni analizzati. L'area 4 presenta anch'essa caratteristiche simili all'area 1, relativamente alla presenza di polipeptidi riconducibili a una potenziale degradazione delle isoforme

caseiniche intere. Nell'area 5 è possibile localizzare, grazie alle peculiari caratteristiche di migrazione in 2D, i due principali allergeni del siero (beta- lattoglobulina e alfa-lattoalbumina). I gel rappresentati in figura 1B sono quindi stati analizzati utilizzando il software Progenesis SameSpot per avere informazioni specifiche sull'espressione di ciascuno spot e valutare da un punto di vista statistico eventuali differenze significative tra i campioni analizzati.

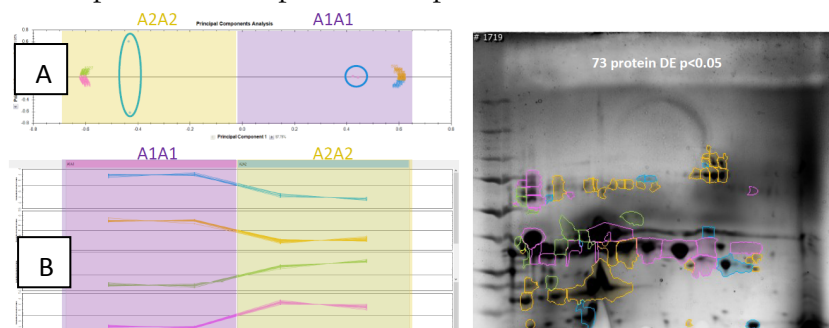


**Fig. 1.** A) Gel monodimensionale rappresentativo dei campioni di latte A1A1 e A2A2 (frazione caseine, C e frazione di sieroproteine, S). B) Elettroforesi 2D rappresentativa della frazione caseinica dei campioni di latte A1A1 e A2A2 frazionati (i riquadri rossi rappresentano la frazione caseinica, i riquadri verdi la frazione delle sieroproteine).

Il grafico PCA riportato in figura 2A mostra una chiara divisione dei due gruppi sperimentali analizzati sulla base dei profili proteici dei gel 2D. In particolare, è possibile notare come i campioni A2A2 (spot celesti nel cerchio blu, nell'area gialla) formano un cluster omogeneo nella parte sinistra del grafico e i campioni A1A1 (spot rosa nell'area lilla) nella parte destra. Questo è indice di una certa riproducibilità tra i campioni replicati all'interno di ogni gruppo. È possibile, inoltre, risalire alle proteine associate alla divisione nei cluster descritti, queste sono riportate in forma di codice numerico e in colori differenti sul grafico a lato di ciascun cluster.

I valori di espressione associati a tali proteine sono quindi stati riportati graficamente nella figura 2C. In base all'analisi statistica 73 proteine risultano differenzialmente espresse con un p value <0.05 tra i campioni A1A1 e i campioni A2A2. In particolare, i profili di espressione della figura 2B indicati dalle linee gialle e celesti rappresentano le proteine che risultano over-espresse nel gruppo A1A1 e under-espresse in A2A2. Viceversa, i profili di espressione della figura 2B indicati dalle linee verdi e fucsia rappresentano le proteine che risultano over-espresse nel gruppo A2A2 e under-espresse in A1A1.

Ciascuna proteina è stata quindi evidenziata nel gel 2D (figura 2C) in base ai colori dei profili di espressione della figura 2B in modo da valutare in maniera più precisa le variazioni d'espressione associate alle singole isoforme. In particolare, le sieroproteine indicate in giallo e celeste risultano essere over-espresse nei campioni A1A1 rispetto a quelle dei campioni A2A2. Le caseine indicate in fucsia e verde risultano essere maggiormente espresse nei campioni A2A2 rispetto ai campioni A1A1.



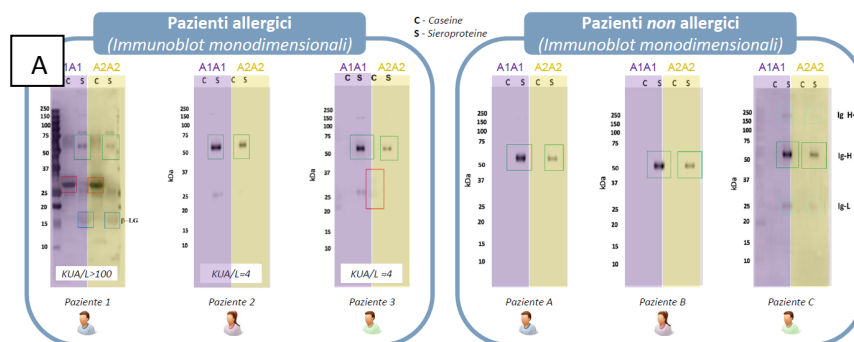
**Fig. 2.** A) Biplot PCA dei gel 2D analizzati B) diagramma dei profili di espressione delle proteine statisticamente differenti tra i gruppi sperimentali analizzati. C) gel 2D rappresentativo dei campioni di latte analizzati. Sono evidenziate in colori differenti le isoforme proteiche differenzialmente espresse ( $p < 0.05$ ) tra i gruppi sperimentali analizzati.

## 6. Differenze di immunoreattività tra varianti A1A1 vs A2A2.

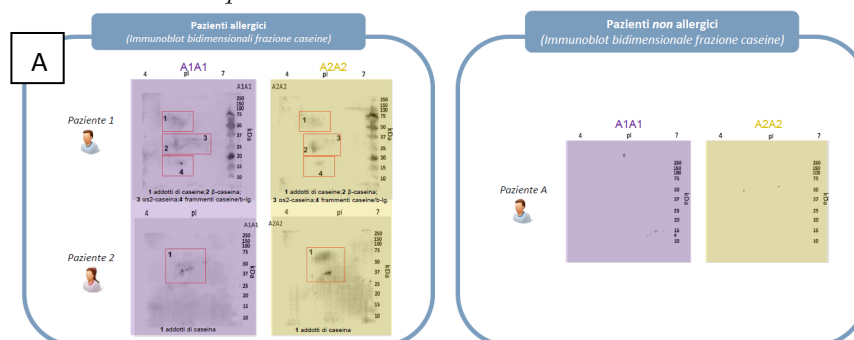
La seconda parte del lavoro, ha avuto come obiettivo quello di studiare, mediante tecniche di immunoproteomica, le eventuali differenze e reattività immunologiche delle varie componenti dei due tipi di latte, in 5 soggetti pediatrici poliallergici di età compresa tra 6 e 12 anni.

I campioni sono stati reclutati presso la Casa Pediatrica dell'Ospedale Fatebenefratelli e Oftalmico e selezionati in base ai criteri di inclusione ed esclusione riportati nei documenti approvati dal Comitato Etico (ver. 3/protocollo dal titolo "*Valutazione delle caratteristiche funzionali e allergiche di latte bovino con  $\beta$ -caseina nelle varianti A1A1 vs A2A2*").

Gli immunoblot mono e bidimensionali ottenuti evidenziano una maggiore reattività del paziente-1 verso molte componenti del latte sia A1A1 sia A2A2, mentre gli altri soggetti in esame mostrano una blanda reattività verso la frazione caseinica non evidenziando differenze sostanziali nei due tipi di latte. La differente reattività dei sieri dei pazienti allergici potrebbe essere spiegata dalla differente situazione immunologica dei soggetti: in particolare, il paziente 1, con un kUA/L (unità di risposta delle IgE che identifica la quantità di anticorpi IgE specifici per l'allergene) maggiore di 100, evidenzia un alto titolo di IgE libere, testimoniando una maggiore reattività e quindi un segnale molto forte (identificabili nella fig. 3A dalla intensità della colorazione della banda di migrazione evidenziata nel riquadro rosso) a livello delle caseine; mentre gli altri soggetti hanno un kUA/L di poche unità e pertanto evidenziano una minore reattività. (Fig. 3). (Fig. 4).



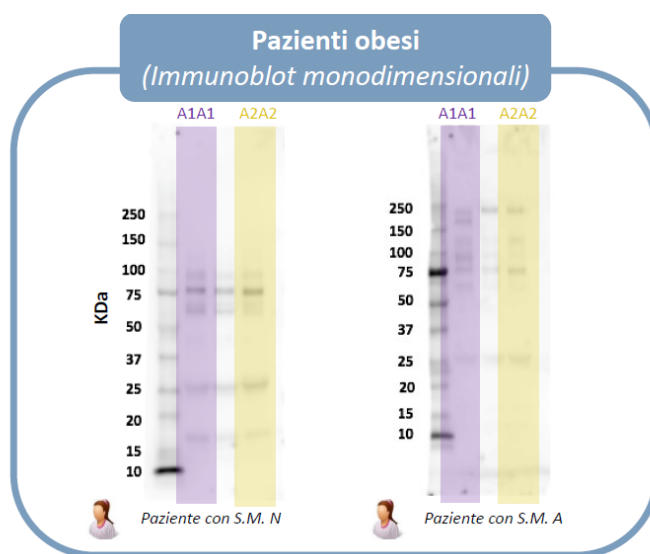
**Fig. 3.** A) Western blot monodimensionali di latte A1A1 e A2A2 incubati con sieri dei pazienti allergici (frazione caseine, C e frazione di sieroproteine, S). Le proteine immunoreattive sono evidenziate nei riquadri. B) Western blot monodimensionali di latte A1A1 e A2A2 incubati con sieri dei pazienti di controllo (frazione caseine, C e frazione di sieroproteine, S). Le proteine immunoreattive sono evidenziate nei riquadri.



**Fig. 4.** A) Western blot 2D di latte A1A1 e A2A2 (frazione caseine) incubato con siero del paziente 1. Le proteine immunoreattive sono evidenziate nei riquadri rossi: 1) addotti di caseine – 2) beta caseina – 3) alfa2caseina – 4) frammenti di caseina/b-lg. Western Blot 2D di latte A1A1 e A2A2 (frazione caseine) incubato con siero del paziente 2. Le proteine immunoreattive sono evidenziate nei riquadri rossi: 1) addotti caseine. B) Western Blot 2D di latte A1A1 e A2A2 (frazione caseine) rappresentativo dei controlli analizzati.

Durante la sperimentazione i pazienti non allergici ma diagnosticati successivamente con sindrome metabolica (condizione determinata dalla presenza simultanea di diabete, pressione alta e obesità), a causa del loro stato infiammatorio, sono risultati reattivi alle proteine del latte. (Fig. 5.).

In particolare, fra i pazienti reclutati inizialmente come controlli è stata evidenziata nelle prove preliminari una elevata reattività verso molte componenti del latte pertanto abbiamo effettuato un approfondimento anamnestico attraverso l'analisi delle cartelle cliniche. Tale approfondimento ci ha permesso di evidenziare che 2 soggetti non allergici, tuttavia, presentavano una situazione patologica di obesità. La figura 5 riporta 2 Western blot monodimensionali dei lattini in esame incubati con il siero dei 2 pazienti obesi con sindrome metabolica dai quali si evidenzia una reattività diffusa con la presenza di numerose bande riconosciute dagli anticorpi di questi soggetti che evidenziano uno stato infiammatorio diffuso con reattività verso molte componenti del latte. In effetti in questo caso i 2 western blot sono stati realizzati senza il frazionamento in 2 componenti: sieroproteine e caseine.



**Fig. 5.** A) Western Blot monodimensionale di latte A1A1 e A2A2 incubato con sieri di pazienti affetti da sindrome metabolica.



## 7. Conclusioni.

Questo lavoro sperimentale evidenzia a livello elettroforetico mono e bidimensionale differenze tra i campioni del latte bovino con  $\beta$ -caseina A1 e  $\beta$ -caseina A2 che potrebbero influire sui tagli molecolari che avvengono durante la digestione e che caratterizzano differenti isoforme delle caseomorfine che vengono a formarsi dalle  $\beta$ -caseine. Tali modificazioni potrebbero comportare una differente reattività immunologica e una differente funzionalità.

Per quanto riguarda la differente reattività immunologica nei pazienti allergici, vista l'esiguità del campione autorizzato dal comitato etico, non è stato possibile ottenere risultati di reattività differente per le due isoforme, tuttavia, dall'analisi effettuata è stato possibile confermare la correlazione diretta tra le kUA/L per le IgE e l'immunoreattività verso alcune proteine del latte, e risultano pertanto del tutto preliminari.

In particolare, i risultati della sperimentazione evidenziano che per ottenere dei risultati utili si deve

indirizzare il campionamento verso soggetti con un kUA/L maggiore o uguale a 100, in quanto i soggetti allergici ma con un kUA/L basso non evidenziano una reattività sufficiente.

I risultati da noi ottenuti forniscono utili informazioni per una selezione più mirata dei soggetti da sottoporre ad analisi per ampliare i dati e dare informazioni significative sulla reale allergenicità dei diversi tipi di caseina.

Da ultimo, i risultati ottenuti nei soggetti non allergici presenti nel reparto pediatrico del Fatebenefratelli e Oftalmico con sindrome metabolica, ci ha consentito di evidenziare come questa situazione metabolica sia correlata ad una reattività diffusa, anche questa evidenza può costituire un punto di partenza per cercare di meglio comprendere questa situazione patologica.

I risultati ottenuti, seppur preliminari, costituiranno la base di future investigazioni con una selezione di pazienti superiore così da

poter definire da un punto di vista funzionale il ruolo della variante A2A2 nelle allergie al latte vaccino.

**Raffaella Memmola,  
Alessio Soggiu,  
Luigi Bonizzi**

*ABSTRACT*

Il latte vaccino è uno degli alimenti più usato nell'alimentazione umana. Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha evidenziato differenze tra la variante  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2. In particolare, l'isoforma A2A2 sembrerebbe essere correlata a minori disturbi in ambito cardiopatico, diabetico, nello sviluppo del sistema immunitario del bambino, oltre ad avere una correlazione negativa con determinate allergie e intolleranze. In questo articolo si descrivono le differenze quantitative e qualitative delle due isoforme proteiche e la differente reattività dei pazienti allergici e non nei confronti delle due varianti di caseina.

EN:

Cow's milk is one of the most used foods in human nutrition. In recent years, scientific research has highlighted differences between the  $\beta$ -casein variant A1A1 and A2A2. In particular, the A2A2 variant seems to be linked to minor disorders related to heart, diabetes, and the development of the child's immune system. This, furthermore, seems to have a negative relationship with certain allergies and intolerances. The aim of this article is to deep dive into the quantitative and qualitative differences of the two protein isoforms and the different reactivity of allergic and non-allergic patients towards the two casein variants.

*PAROLE CHIAVE*

Latte vaccino – selezione genetica – differenze  $\beta$ -caseina A1A1 e A2A2 – allergenicità – sindrome metabolica.

Cow's milk – genetic selection – differences in  $\beta$ -casein A1A1 e A2A2 – allergy – metabolic syndrome