

**Pro gradu -tutkielma**

**Kumipuun Hevb2-proteiinin puhdistus, tunnistus ja  
karakterisointi sekä merkitys  
luonnonkumiallergeenina**

**Anu Karinen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

17.11.2020

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Solu- ja molekyylibiologia

Anu Karinen: Kumipuun Hevb2-proteiinin puhdistus, tunnistus ja karakterisointi sekä merkitys luonnonkumiallergeenina  
Pro gradu -tutkielma: 95 s., 6 liitettä (14 s.)  
Työn ohjaajat: FT Nisse Kalkkinen, FT Leena Valmu ja professori Jari Yläne  
Tarkastajat: professori Perttu Permi ja professori emeritus Matti Vuento

Marraskuu 2020

---

Hakusanat:  $\beta$ -1,3-glukanaasi, B-seerumi, *Hevea brasiliensis*, IgE-vasta-aine, lateksi, luonnonkumiallergia, massaspektrometria, nestekromatografia

Välitön tyyppi I luonnonkumiallergia on IgE-välitteinen allerginen reaktio, jota esiintyy säännöllisesti luonnonkumituotteiden kanssa kosketuksiin joutuvilla henkilöillä. Luonnonkumiallergia aiheutti varsinkin 1990-luvulla vakavia ongelmia erityisesti terveydenhuollon työntekijöille ja potilaille, jotka ovat syntymästään lähtien läpikäyneet lukuisia kirurgisia toimenpiteitä, kuten selkärankahalkiolapset. Vaikka huomattavaa edistymistä on tapahtunut luonnonkumiallergian tunnistamisessa ja ehkäisyssä, voi se yhä olla kehittyvässä, mutta myös teollistuneissa maissa merkittävä työperäinen sairaus tai aiheuttaa allergisia reaktioita riskiryhmiin kuuluvilla, jotka käyttävät luonnonkumisia lääkinnällisiä tai kotitaloustuotteita. Tähän mennessä 15 luonnonkumin proteiinia on saanut allergeeniluokituksen. Näistä yksi, Hevb2 ( $\beta$ -1,3-glukanaasi), on tunnistettu ja kloonattu, mutta sen merkitys allergeenina on jäänyt epäselväksi. Tässä tutkimuksessa Hevb2-proteiini puhdistettiin ultrasentrifugoidun luonnonkumin pohjafraktiosta (B-seerumi) kationinvaihto-, geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla. Proteiinin tunnistamisessa ja sen rakenteen karakterisoinnissa käytettiin geelielektroforeesia, MALDI-TOF MS (matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria), ESI (sähkösumutus-ionisaatio) MS ja MS/MS -menetelmiä sekä N-terminaalista sekvensointia. Immunologinen karakterisointi suoritettiin ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys) ja Western blot -menetelmillä käyttämällä suomalaisten potilaiden seerumeja, joista muutama oli peräisin myös luonnonkumiallergisilta potilailta. Hevb2-proteiinin havaittiin esiintyvän kahtena, molekyylipainoltaan 36,4 ja 37,6 kDa kokoisena isomuotona. Isomuodot tunnistettiin ja niiden yhteys määritettiin massaspektrometrisesti peptidisormenjälkien avulla. Molemmat olivat N-terminaalisesti blokattuja, jonka aiheutti 36,4 kDa isomuodolla syklinen pyroglutamiinihappo. ELISA-immunomäärityksessä vain 10 %:lla (7/71) potilaista löytyi spesifistä IgE-vasta-ainetta 36,4 kDa Hevb2-proteiinille. Vaikka tämän alustavan kokeen perusteella Hevb2-proteiini ei vaikuttaisi olevan merkittävä luonnonkumiallergeeni suomalaisilla potilailla, tutkimus on syytä toistaa valikoituneemmalla potilas- ja kontrollijoukolla niin, että molemmat isomuodot analysoidaan yhdessä ja proteiininäytteen puhtaus varmistetaan vielä esimerkiksi saatavilla olevilla monoklonaalisilla vasta-aineilla.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Cell and Molecular Biology

Anu Karinen: Purification, identification and characterization of Hevb2 protein of rubber tree and its significance as latex allergen  
MSc thesis: 95 p., 6 appendices (14 p.)  
Supervisors: Ph.D. Nisse Kalkkinen, Ph.D. Leena Valmu and professor Jari Yläne  
Inspectors: professor Perttu Permi and professor emeritus Matti Vuento

November 2020

Type I immediate hypersensitivity to natural rubber latex (NRL) is an IgE-mediated allergic reaction recognized in individuals who are frequently in contact with NRL products. NRL allergy has particularly in the 1990s caused the serious problems especially among health care workers and patients who have undergone multiple surgical operations, such as spina bifida children. Although substantial progress has been made in the understanding and prevention of NRL allergy, it may still be an important disease in developing but also in industrialized countries among person with occupational exposure to NRL gloves and among individuals belonging to risk group and using latex-containing medical or household products. To date, 15 latex proteins have received an international nomenclature designation as allergens. One of these, Hevb2 ( $\beta$ -1,3-glucanase) has been identified and cloned but its significance as latex allergen has remained ambiguous. In this study, Hevb2 was purified from the bottom fraction (B-serum) of ultracentrifuged NRL by cation-exchange chromatography, gel filtration and reversed-phase chromatography. Identification and characterization of Hevb2 was performed using gel electrophoresis, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS), electrospray ionization (ESI) MS and MS/MS as well as N-terminal sequencing. Immunological characterization of Hevb2 was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting (Western blotting) using sera of Finnish patients, including also a few NRL allergic patients. Hevb2 protein occurred in two isoforms, 36.4 and 37.6 kDa according to mass spectrometry. The identity and the relationship of these two isoforms was demonstrated by peptide mass fingerprinting. Both isoforms were found to be N-terminally blocked but only the blocking group of 36.4 kDa Hevb2 was demonstrated to be a cyclic pyroglutamic acid. In ELISA, only 10 % (7/71) of sera from Finnish patients showed specific IgE antibodies to purified 36.4 kDa Hevb2. While this preliminary study demonstrated that highly purified 36.4 kDa Hevb2 appears not to be major latex allergen among Finnish population, more study is still needed with more selected patient and control group, and performing experiment so that the both isoforms are analysed together and the purity of protein preparation is further ascertained e.g. by monoclonal antibodies.

# SISÄLLYSLUETTELO

## LYHENTEET

1	JOHDANTO.....	1
1.1	Allergia .....	1
1.1.1	Allergeenit ja niiden ominaispiirteet.....	1
1.1.2	Allergeenien nimeäminen.....	5
1.1.3	Allergiset sairaudet.....	6
1.1.4	Allergiset yliherkkyysoireet.....	9
1.1.5	Nopean IgE-välitteisen (tyypin I) allergian reaktiomekanismi.....	9
1.2	Luonnonkumi .....	12
1.2.1	<i>Hevea brasiliensis</i> -kumipuun tuotanto .....	12
1.2.2	Muita luonnonkumia tuottavia kasveja.....	13
1.2.3	Lateksin koostumus.....	13
1.2.4	Lateksin keräys ja tuotteiden valmistusprosessi.....	16
1.3	Luonnonkumiallergia .....	20
1.3.1	Historia .....	21
1.3.2	Riskiryhmät ja -tekijät sekä yleisyys .....	24
1.3.3	Oireet .....	25
1.3.4	Diagnosointi ja hoito.....	26
1.3.5	Merkittävimmät luonnonkumin allergeenit .....	30
1.3.6	Hevb2 ( $\beta$ -1,3-glukanaasi) .....	33
1.3.7	Ristiallergia ja lateksi-hedelmä-oireyhtymä .....	38
2	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	41
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	42

3.1	Lähtömateriaali.....	42
3.2	Potilasseerumit .....	42
3.3	Hevb2-proteiinin puhdistus nestekromatografisilla menetelmillä.....	43
3.3.1	Geelisuodatuskromatografia.....	44
3.3.2	Kationinvaihtokromatografia.....	44
3.3.3	Käänteisfaasikromatografia.....	44
3.4	Puhdistetun Hevb2-proteiinin tunnistus ja karakterisointi .....	46
3.4.1	Geielektroforeesi .....	46
3.4.2	Alkylointi ja entsyymaattinen digestio .....	46
3.4.3	Peptidien analysointi ja proteiinin tunnistus (MALDI-TOF MS) .....	47
3.4.4	Proteiinin molekyylipainon määrittäminen (MALDI-TOF MS, ESI MS).....	48
3.4.5	N-terminaalinen sekvensointi .....	49
3.4.6	N-terminaalisen peptidin sekvensointi (ESI MS/MS).....	49
3.4.7	Deglykosylaatioanalyysi.....	49
3.5	Hevb2-proteiinille spesifisen IgE-vasta-aineen osoitus suomalaisten potilaiden seerumeista immunologisilla analyyseillä .....	50
3.5.1	IgE-ELISA.....	50
3.5.2	Western blot.....	51
4	TULOKSET .....	53
4.1	Hevb2-proteiinin puhdistus B-seerumista .....	53
4.2	Hevb2-proteiinin puhdistus vasta-ainemäärittäystä varten .....	54
4.3	Hevb2-proteiinin tunnistus peptidien massasormenjälkien avulla (MALDI-TOF MS).....	56
4.4	Hevb2-proteiinin karakterisointi .....	57
4.4.1	Molekyylipainon määrittäminen (MALDI-TOF MS ja ESI MS) .....	57

4.4.2	Proteiinin N-terminaalinen sekvensointi sekä N-terminaalisen peptidin analysointi (MALDI-TOF MS) ja sekvensointi (ESI MS/MS) .....	60
4.4.3	Deglykosylaatioanalyysi .....	64
4.5	Hevb2-proteiinin immunologiset analyysit .....	65
4.5.1	IgE-vasta-aineiden osoitus ELISA-menetelmällä .....	65
4.5.2	Western blot -analyysi .....	66
5	TULOSTEN TARKASTELU .....	68
	KIRJALLISUUS .....	78
	LIITTEET .....	96

Liite 1: Luonnonkumille allergisten potilaiden seeruminäytteet

Liite 2: Trypsiinillä digestoidun Hevb2-proteiinin peptidien analysointi (MALDI-TOF MS)

Liite 3: Hevb2-proteiinin tunnistus MALDI-TOF-peptidimassasormenjälkien avulla ProFound-tietokantahakuohjelmalla

Liite 4: Kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetun Hevb2-proteiinin molekyylipainon määrittäminen (ESI MS)

Liite 5: Hevb2-proteiinin laskennalliset peptidimassat (Expasy) sekä aminohapposekvenssi (PAWS)

Liite 6: ELISA-analyysien mittaustulokset ja tulosten normalisointi

## LYHENTEET

ACN	asetonitriili
CCD	ristireagoiva hiilihydraattideterminantti, cross-reactive carbohydrate determinant
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	sähkösumutus-ionisaatio
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HSA	ihmisen seerumin albumiini
IgE	immunoglobuliini E -vasta-aine
kDa	kilodalton
MALDI	matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio, matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	massaspektrometria
MS/MS	tandemmassaspektrometria
NRL	luonnonkumi, natural rubber latex
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
pI	isoelektrinen piste
PBS	fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PBS-T	fosfaattipuskuroitu suolaliuos-Tween

PBS-T-HSA	fosfaattipuskuroitu suolaliuos-Tween-ihmisen seerumin albumiini
PVDF	polyvinyylidifluoridi
Q-TOF	kuadrupoli-lentoaika, quadrupol-time-of-flight
RP	käänteisfaasi, reversed-phase
RT	huoneenlämpö, room temperature
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
TBS	Tris-puskuroitu suolaliuos
TFA	trifluoroetikkahappo
TOF	lentoaika, time-of-flight
4-VP	4-vinyylipyridiini



# 1 JOHDANTO

## 1.1 Allergia

Yli 25 % teollistuneiden maiden väestöstä kärsii Immunoglobuliini E (IgE)-välitteisistä allergioista (Valenta 2002). Allergian kehittyminen on monivaiheinen tapahtumasarja, ja mekanismit, jotka johtavat herkistymiseen, IgE-vasta-aineiden tuotantoon ja allergisiin sairauksiin ovat monimutkaisia ja eivät täysin tunnettuja (Bredehorst ja David 2001). Allergia on immunologisten mekanismien välittämä, haitallinen reaktio, jossa elimistö kehittää vasteen yleensä elimistön ulkopuolelta tullutta ainetta vastaan. Immuunivasteen aiheuttamaa ainetta kutsutaan antigeeniksi ja allergisen reaktion aiheuttavaa antigeenia allergeeniksi (Haahtela ym. 2007).

### 1.1.1 Allergeenit ja niiden ominaispiirteet

Tavallisimmin allergeeni on valkuaisaine, mutta allergiaa voivat aiheuttaa myös metallit ja kemikaalit, jotka muuttuvat allergeeneiksi usein vasta sen jälkeen, kun ne ovat sitoutuneet elimistön omiin kantajavalkuaisaineisiin. Lääkeallergiassa allergeenina voi toimia itse lääke tai sen aineenvaihdunnan tuote, metaboliitti tai lääkevalmisteen apuaine. Jokin fysikaalinen tekijä voi myös muuttaa aineen allergeeniksi, kuten auringon ultraviolettivalo yhdessä lääkkeen tai kemikaalin kanssa (Haahtela ym. 2007). Jotkut allergeenit voivat olla myös lipidejä tai hiilihydraatteja (Galli ym. 2008). Allergeenejä esiintyy yleisimmin heinien ja puiden siitepölyssä, eläinten hilseessä, ruoka-aineissa (erityisesti puupähkinät, maapähkinä, kala, äyriäinen, maito, kanamuna, soijapapu ja vehnä), luonnonkumissa, tietyissä lääkkeissä ja hyönteismyrkyissä sekä pölypunkeissa (Stanley ja Bannon 1999, Galli ym. 2008).

Allergeenisten proteiinien tai glykoproteiinien molekyylipaino on yleisimmin välillä 5–70 kDa (Stanley ja Bannon 1999, Hoffmann-Sommergruber 2000, Huby ym. 2000, Bredehorst ja David 2001). Ei tiedetä miksi toiset proteiinit ovat allergeeneja

ja toiset eivät, mutta arvellaan, että ominaisuus saattaa liittyä proteiinimolekyylien kolmiulotteisen rakenteen erityispiirteisiin (Haahtela ym. 2007). Rakenteellisilla ominaispiirteillä on tärkeä rooli proteiinin kyvyssä muuntaa immuunivaste kohti allergista reaktiota (Bredehorst ja David 2001). Proteiimirakenteen piirteet, jotka todennäköisesti ovat allergeenisuuden kannalta merkityksellisiä, ovat liukoisuus, stabiilisuus, koko ja laskostumistiiviys (Aalberse 2000). Immunologisen näkökulman kannalta proteiinin rakenteellisilla tunnistus- ja sitoutumiskohdilla eli epitoopeilla on tärkeä rooli proteiinin allergeenisen luonteen ymmärtämisessä. Niitä proteiinien epitoopeja, jotka ovat T-solujen kanssa vuorovaikutuksessa, kutsutaan T-soluepitoopeiksi ja IgE:hen sitoutuvia B-soluepitoopeiksi (Bredehorst ja David 2001).

IgE-välitteisessä allergiareaktiossa allergeeni kuvaa antigeeniä, jonka IgE:hen sitoutuminen käynnistää allergisen vasteen ensiherkistymisen jälkeen. Allergeenien tärkein ominaisuus, joka erottaa ne ei-allergeenisista proteiineista, on kyky herkistää alttiita yksilöitä (Aalberse 2000). Lisäksi allergeenille tärkeä ominaispiirre on allergisen immuunivasteen aikaansaaminen (Masilamani ym. 2012). Vaikka täydellisillä allergeeneilla on kaikki nämä ominaisuudet, on olemassa proteiineja, joiden tiedetään aikaansaavan allergisia reaktioita, mutta jotka eivät yleensä herkistä (Aalberse 2000). Immuunivasteen käynnistämiseksi allergeenien tulee päästä kosketuksiin immuunisolujen kanssa (Pekar ym. 2018). Proteiinien allergeenisuuteen vaikuttavista tyypillisistä ominaisuuksista, kuten liukoisuudesta, stabiilisuudesta, koosta ja erilaisista muista molekulaarisista ominaisuuksista, on lukuisia tutkimuksia (Aalberse 2000, Huby ym. 2000), sillä nämä ovat tärkeitä ominaisuuksia proteiineille niiden pääsemiseksi spesifisille immuunivasteen käynnistyspaikoille. Lisäksi tietyn elimistölle vieraan proteiinin tulee olla ihmisen ympäristössä läsnä huomattavia määriä ja mieluiten pitkittyneitä aikoja tullakseen allergeeniksi (Bredehorst ja David 2001). On selvää, että osa proteiineista on olennaisesti allergeenisempia kuin toiset, mutta haasteena on ollut tunnistaa ne merkittävälle allergeeneille uniikit ominaispiirteet, jotka antavat niille kyvyn

aiheuttaa allergista herkistymistä ja allergisia sairauksia (Huby ym. 2000). Vaikuttaa siltä, että useat tekijät yhdessä vaikuttavat atooppisen yksilön herkistymiseen mahdollisen allergeenin kohdatessaan. Nämä ovat 1.) altistuneen henkilön geneettinen perimä, 2.) allergeenin rakenne ja 3.) allergeenin biokemialliset ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (Breiteneder ja Mills 2005).

Allerginen reaktiotapahtuma on riippuvainen monimutkaisesta immuunijärjestelmän ja proteiinin välisestä vuorovaikutuksesta (Huby ym. 2000). Arvioitaessa miksi toinen proteiini on merkittävämpi allergeeni kuin toinen, on altistustasolla ja -reitillä ilmeinen merkitys. Myös yhtäläisyydet ihmisen homologisiin proteiineihin täytyy huomioida, mutta yhteys on todennäköisesti monimutkainen ja riippuu ihmisen proteiinien pääsystä immuunijärjestelmän toleranssikoneistoon (Aalberse 2000). Vaikka proteiinien monet rakenteelliset piirteet vaikuttavat niiden allergeenisuuteen (Huby ym. 2000), niiden harvoin havaitaan olevan yleisiä kaikille allergeeneille - siitäkään huolimatta, että monet allergeeneista voidaan ryhmitellä pienempiin rakenteellisiin luokkiin. Tähän löytyy myös poikkeuksia. Proteiinit voivat ristireagoida keskenään ainoastaan vain silloin, kun ne jakavat yhteisiä rakenteellisia samankaltaisuuksia, esimerkiksi ristireagoivilla glykoproteiineilla on havaittu yhtäläisyyksiä hiilihydraatti- eli glykaanirakenteissa. Kaikilla ristireagoivilla proteiineilla on löydetty myös samanlainen laskostumistapa, mutta toisaalta samankaltaisesti laskostuneet proteiinit eivät välttämättä kykene ristireagoimaan (Aalberse 2000).

Allergeenin stabiilisuus voidaan määritellä proteiinin kykyä säilyttää sen natiivi kolmiulotteinen rakenne kemiallisten (esim. happamuus), fysikaalisten (esim. lämpötila) ja entsyymaattisten (esim. proteaasit) käsittelyjen jälkeen (Breiteneder ja Mills 2005). Allergeenit pääsevät ihmisen elimistöön kahta kulkeutumisreittiä pitkin: ihon tai ruoansulatuskanavan ja hengitysteiden limakalvon kautta. Ihon kautta kulkeutuessaan allergeenin tulee ylittää epidermaalinen este. Ehjän ihon uloimman esteen läpi päästäkseen allergeenillä tulee olla ihon rakenteellisten piirteiden takia hydrofobisia ominaisuuksia tai sen tulee pystyä sitoutumaan

lipofiiliseen kantajamolekyyliin. Vaikka hengitettäviltä allergeeneilta ei vaadita samanlaista spesifistä stabiilisuutta matalia pH-tasoja tai entsyymejä vastaan toisin kuin syötäviltä allergeeneilta, koko ja liukoisuus ovat kuitenkin tärkeitä ominaisuuksia, jotta ne pystyvät läpäisemään hengitysteiden limakalvon (Aalberse 2000, Pekar ym. 2018). Ruoansulatuskanavan kautta tapahtuva herkistyminen vaatii proteiinilta korkeampaa stabiilisuutta proteolyttisiä ja hydrolyyttisiä olosuhteita vastaan (Breiteneder ja Mills 2005). Monet allergeenit, erityisesti ruokaperäiset, kestävät stabiileina molekyyleinä hyvin kuumennusta ja ovat prosessin- ja digestionkestäviä (Lehrer ym. 1996, Huby 2000, Bannon 2004, Pekar ym. 2018). Monilla proteiiniallergeeneilla on entsyymaattista aktiivisuutta ja useat ovat proteaaseja, joten ne voivat heikentää epiteeliesteen toimintaa (Pekar ym. 2018) tai pilkkoa sellaisia reseptoreita, kuten CD23, CD25 ja CD40 (Bredehorst ja David 2001, Galli ym. 2008), joilla on vaikutusta Th2-soluvasteen (engl. T-helper) kehittymiseen ja edelleen vasta-aineiden muodostumiseen (Aalberse 2000). Toisaalta on olemassa myös entsyymaattisesti aktiivisia kasviallergeeneja, kuten vihannesten ja hedelmien tuottamat sienten soluseinän kitiiniä hydrolysoivat luokan I kitinaasit, jotka useista ruoka-allergeeneista poiketen eivät ole lämmön- ja digestionkestäviä, mutta jotka siitä huolimatta säilyttävät allergeenisen kapasiteetin. On arvioitu, että niiden molekyylinsisäiset disulfididokset, erityisesti proteiinin N-terminaaliossa kitiiniä sitovassa domainissa (heveinin kaltainen domaini), jossa myös pääasiassa IgE:hen sitoutuvat B-soluepitoopit sijaitsevat, pitävät digestoidun proteiinin kasassa immunologisesti aktiivisessa muodossa (Díaz-Perales ym. 2002, Díaz-Perales ym. 2003, Theis ja Stahl 2004, Breiteneder ja Mills 2005).

Monet allergeeneista ovat lisäksi solunulkoisia proteiineja, joten proteiini käy solusta ulos erittyessään solulimakalvostolla (endoplasmakalvosto) läpi N-terminaalisen signaalipeptidin poistamisen sekä muita posttranslacionaalisia modifikaatioita. Nämä proteiinisynteesin jälkeiset muokkaukset voivat vaikuttaa proteiinin allergeenisuuteen monin tavoin, mm. kyvyllä muodostaa lukuisia

erilaisia vasta-ainespesifisiä epitooppeja. Glykosylaatioissa sokeriosat eli glykaanit liittyvät kovalenttisesti useimmiten aminohappoketjussa asparagiinin aminoryhmään (N-glykosidinen sidos) sekä seriin ja/tai treoniinin alkoholiryhmään (O-glykosidinen sidos). Kasviglykoproteiineille proliinien ja lysiinien hydroksylaatio on lisäksi yksi tärkeistä modifikaatiotapahtumista ja hydroksyloituneet aminohapot voivat myös glykosyloitua (Aalberse 2000). Glykaanit ovat olennainen osa glykoproteiinia ja glykosylaatio voi vaikuttaa proteiinin fysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten sen stabiilisuuteen, liukoisuuteen, hydrofobisuuteen, sähkövaraukseen ja alttiuteen proteaaseja kohtaan, ja siten edelleen proteiinin antigeeniseen ja allergeeniseen potentiaaliin (Aalberse 2000, Huby ym. 2000, Breiteneder ja Mills 2005). Toisaalta glykosylaatio voi vaikuttaa suoraan proteiinin immunologisiin ominaisuuksiin muuttamalla proteiinin pinnalla esiintyviä B-soluepitooppeja. Tämän takia proteiinin kykyä saada aikaan kliinisiä oireita herkistyneillä yksilöillä voidaan vähentää deglykosylaatiolla. Vastaavasti T-soluepitooppien glykosylaatio voi muuttaa ne enemmän tai vähemmän antigeeniseksi (Huby ym. 2000). Vaikka osa tärkeistä allergeeneista on voimakkaastikin glykosyloituneita, tavataan myös allergeenejä, jotka eivät ole glykosyloituneita (Aalberse 2000), joten glykosylaatiota ei voida pitää merkittävänä kaikkia allergeenejä yhdistävänä tekijänä.

### 1.1.2 Allergeenien nimeäminen

Allergeenien systemaattinen nimeäminen sai alkunsa 1980-luvun alkupuolella, kun ryhmä tutkijoita kehitti Linnaeuksen taksonomiaan perustuvan nimeämisjärjestelmän. Vuonna 1986 perustetun WHO/IUIS alakomitean päämääränä oli yhdenmukaistaa ihmiselle IgE-välitteistä allergiaa aiheuttavien allergeenien nimeäminen. Allergeenit on nimetty hyväksytyyn taksonomisen nimen mukaan. Kolme ensimmäistä kirjainta kertoo suvun, seuraava kirjain lajin ja lopun juokseva numerointi sen, missä järjestyksessä ne on tunnistettu. WHO/IUIS allergeeninimikkeistön tietokanta sisältää nykyään yli 990 tunnettua proteiiniallergeenia (<http://www.allergen.org>).

### 1.1.3 Allergiset sairaudet

Allergiset sairaudet käsittävät laajan kirjon kliinisiä oireita ja tiloja (Potaczek ym. 2017). Allergisiin sairauksiin liittyy useita mekanismeja, mutta suurin osa näistä on IgE-välitteisiä reaktioita (Antó ym. 2012). Nopeaa IgE-välitteistä allergiaa kutsutaan usein myös atooppiseksi allergiaksi, jonka oireita ovat allerginen astma, allerginen nuha (riniitti), allerginen silmän sidekalvotulehdus (konjunktiviitti), atooppinen ihottuma (ekseema, dermatiitti), allerginen nokkosihottuma (urtikaria), allergiset vatsavaivat (ruoansulatuskanavan oireet) ja äkillinen allergiareaktio (anafylaksia) (Haahtela ym. 2007, Potaczek ym. 2017).

Allergiset sairaudet ovat maailmanlaajuisesti merkittävä terveysongelma ja niiden esiintyvyys on kasvanut niin Suomessa kuin muissakin länsimaissa viime vuosikymmenten aikana. Erityisesti teollistuneissa ja kaupungistuneissa maissa on havaittu kroonisten tulehdussairauksien, kuten allergisten sekä autoimmuunisairauksien kasvua (Bach 2002, Haahtela ym. 2012). Atooppinen allergia on vahvasti perinnöllinen (Haahtela ym. 2007). Ihmisen genomikartoitus on lisännyt ymmärrystä allergisten sairauksien geneettisistä riskitekijöistä. Tutkimusten myötä on tapahtunut huomattavaa edistymistä mm. ekseeman, astman ja riniitin geneettisestä taustasta (Bunyavanich ym. 2011, Ober ja Yao 2011). Joissakin tutkimuksissa on havaittu lapsuusiän allergialla olevan vahvempi yhteys äidin allergiaan kuin isän puolelle (Litonjua ym. 1998, Moore ym. 2004), mutta toisaalta molemmilla vanhemmilla havaittu allerginen astma on merkittävämpi riskitekijä lapsen astman kehittymiselle kuin äidin sairaus yksinään (Mirzakhani ym. 2019).

Allergisten sairauksien nopea yleistyminen ei kuitenkaan yksin selity geneettisillä muutoksilla, vaan kasvun katsotaan johtuvan muutoksista ympäristötekijöissä, joita joissakin tapauksissa epigeneettiset muutokset (eli ympäristöärsykkeiden aiheuttamat toiminnallisesti relevantit genomien muutokset, jotka voivat olla perinnöllisiä, mutta eivät muuta DNA-sekvenssiä) vielä täydentävät (Haahtela ym. 2013, Burbank ym. 2017). Vaikka atooppisten allergioiden esiintyminen selittyy

sekä geneettisillä että ympäristötekijöillä, on arvioitu, että jopa 70–90 % sairastumisriskistä johtuu ympäristön muutoksista (Willett 2002).

Allergisten sairauksien kehittymiseen voivat vaikuttaa useat eri tekijät niin raskauden aikana kohdussa kuin syntymän jälkeen varhaislapsuudessa ja myöhemmin, kuten elintavat, yleinen hygieniataso ja infektiot, ympäristön mikrobeille altistuminen, potentiaalisille allergeeneille altistuminen, synnytystapa, altistumisikä, asuminen maatilalla/maaseudulla/kaupungissa ja lemmikki- ja maatilan eläimet. Allergisten sairauksien kehittymiseen vaikuttavia tekijöitä voivat olla myös ruokavalio, ravintotekijät ja ravintoainepitoisuus (esim. folaatti, D-vitamiini, monityydyttymättömät rasvahapot), lääkkeet, stressi, säteily, tupakointi, ilmansaasteet ja ympäristökemikaalit (Haahtela ym. 2007, Kansanterveyslaitoksen julkaisu 2007, Rappaport ja Smith 2010, Dave ym. 2011, Gern 2015, Burbank ym. 2017, Potaczek ym. 2017, Reynolds ja Finlay 2017). Useiden havaintojen mukaan kohdunsisäisellä ympäristöllä voi olla tärkeä rooli allergian kehittymiselle myöhemmin. (Rindsjö ja Scheynius 2010). Äidin raskaudenaikana ympäristötekijöille altistumisen tiedetään lisäävän lapsen allergian riskiä. Esimerkiksi äidin altistuminen kotieläimille, kotipölyn endotoksiineille ja maatilan ympäristölle suojaa lasta allergiselta herkistymiseltä (Roponen ym. 2005, Ege ym. 2008, Conrad ym. 2009).

Allergisten sairauksien on havaittu johtuvan koko elämänkaaren aikaisista monimutkaisista geeni-ympäristö-vuorovaikutuksista (Rindsjö ja Scheynius 2010, Antó ym. 2012, Burbank ym. 2017). Epigeneettiset mekanismit voivat olla yksi tärkeä tekijä, kuinka nämä vuorovaikutukset voivat vaikuttaa sairauden kehittymiseen. Epigenetiikka voi antaa vihjeitä useisiin havaintoihin, esimerkiksi kuinka jo sikiönkehityksen sekä raskaudenaikaisilla ja syntymän jälkeisillä ympäristötekijöillä voi olla tärkeä rooli, joka ohjaa yksilöä kohti atooppista sairautta (Antó ym. 2012). Esimerkiksi isoäidin tupakoinnin on havaittu lisäävän astman kehittymisriskiä lapsenlapsella verrattuna isoisän tupakoimattomuuteen, ja on riippumaton vanhempien riskistä (Yu-Fen ym. 2005).

Allergioiden lisääntyneen kasvun moderneissa kaupungistuneissa ympäristöissä on havaittu johtuvan puutteellisesti kehittyneestä tai rikkinäisestä toleranssista (sietokyky), jossa immuunijärjestelmä ei tee eroa vaarallisen ja vaarattoman (allergia) eikä oman ja ulkopuolisen (autoimmuunisairaudet) välillä. Immuunijärjestelmän häiriö johtaa asiaankuulumattomiin tulehdusvasteisiin sekä kliinisiin oireisiin. Kasvavissa määrin on saatu näyttöä, että vuorovaikutus sellaisten suojaavien ympäristötekijöiden kanssa, jotka ovat elintärkeitä normaalin toleranssin kehittymiselle (kuten maaperän mikro-organismit), on kaupunkiympäristössä olematonta. Ihmisten vähentynyt yhteys luonnollisen, monimuotoisen ympäristön kanssa voi vaikuttaa epäsuotuisasti ihmisen normaaliin mikrobistoon (ihmisen kommensaalit eli synnynnäinen mikrobiota), joka yhdessä ympäristön mikro-organismien kanssa on tärkeä ihmisen terveydelle (von Hertzen ym. 2011, Haahtela ym. 2012). Saadut tulokset Suomen ja Venäjän Karjalan väestön atooppisten sairauksien esiintyvyyksien yhä kasvavista eroista ovat antaneet sysäyksen biodiversiteettihypoteesin esiin tuomiselle, joka laajentaa hygieniahypoteesia, jossa perheen lasten määrän havaittiin olevan yhteydessä allergian riskiin niin, että esikoisen riski sairastua on suurin ja kuopuksen pienin, kun vanhempien sisarusten infektioiden ajateltiin suojelevan nuorempia allergioilta (Strachan 1989, Strachan ym. 1996, Matricardi ym. 1998). Biodiversiteettihypoteesin sijaan huomioi sekä ihmisen solut, ihon ja limakalvojen (suoli, hengitystiet) mikrobiomit (koko mikro-organismien geneettinen materiaali) että ympäristön mikrobiomit (Laatikainen ym. 2011, von Hertzen ym. 2011, Hanski ym. 2012, Haahtela ym. 2013).

Kaiken kaikkiaan lapsen kehityksen, ympäristön mikrobialtistumisen ja perimän välillä on monimutkainen vuorovaikutusten verkko ja allergia on häiriö tässä vuorovaikutuksessa (Haahtela ym. 2007).



#### 1.1.4 Allergiset yliherkkyyssreaktiot

Allergiset yliherkkyyssreaktiot jaetaan neljään eri tyyppiin Coombsin ja Gellin (1963) luokittelun mukaisesti. Allerginen reaktio voi olla vasta-aine- tai soluvälitteinen (Galli ym. 2008). Reaktioita kutsutaan joko nopeiksi eli välittömiksi tai hitaiksi eli viivästyneiksi.

Näistä välitön IgE-välitteinen eli atooppinen (tyypin I) allergia on tavallisin. Koska useimmat allergeenit ovat helposti vesiliuokseen liukenevia, molekyylipainoltaan pienikokoisia proteiineja tai glykoproteiineja, niin tämä ilmeisesti mahdollistaa allergeenin nopean tunkeutumisen limakalvoille ja edelleen välittömän allergisen reaktion (Stanley ja Bannon 1999).

Toiseksi tavallisin allergia on viivästynyt soluvälitteinen (tyypin IV) allergia. Suuri osa viivästyneestä allergiasta on metallien ja kemikaalien aiheuttamaa kosketusallergiaa, josta tavallisimpana esimerkkinä on nikkeliallergia. Kemikaaleista tätä allergiaa voivat aiheuttaa myös kumin vulkanoimisessa ja muut valmistusprosessissa käytettävät aineet, ns. kumikemikaalit (Kansanterveyslaitoksen julkaisu 2007) Useimmat lääkeaineallergiatkin välittyvät viivästyneellä allergiamekanismilla. Vaikka allergia voi välittyä monella erilaisella immunologisella mekanismilla, muut allergiamekanismit ovat harvinaisia (Haahtela ym. 2007).

Immunologinen reaktiomekanismi erottaa allergian entsyymien puutteesta johtuvista intoleransseista, kuten laktoosi-intoleranssi, vaikkakin allergian ja intoleranssin raja jää usein epäselväksi, esimerkiksi keliakian tapauksessa (Kansanterveyslaitoksen julkaisu 2007).

#### 1.1.5 Nopean IgE-välitteisen (tyypin I) allergian reaktiomekanismi

IgE-vasta-aineen löytämisen jälkeen vuonna 1967 on tullut ilmeiseksi, että tällä vasta-aineella on merkittävä rooli allergisissa sairauksissa. Vaikka sitä esiintyy vasta-aineista vähiten terveiden ihmisten seerumissa, sillä on kyky aiheuttaa

immuunipuolustuksessa voimakasta tulehdusvastetta erilaisissa kudoksissa ja elimissä. Kokonais-IgE:n määrä seerumissa harvoin kuitenkin tarjoaa tietoa allergeenispesifisen IgE:n määrästä, eikä allergeenille spesifisen IgE-vasta-aineen läsnäolo välttämättä johda kliinisesti merkitsevään vasteeseen (Zellweger ja Eggel 2016).

Nopean IgE-välitteisen allergian aiheuttajina ovat yleensä valkuaisaineet, joita on mm. siitepölyssä, eläinpölyssä, ruoka-aineissa tai luonnonkumissa. Myös yksinkertaiset kemikaalit, formaldehydi, lääkeaineet ja etyylialkoholi, voivat aiheuttaa atooppista allergiaa. Oireet alkavat usein muutamien minuuttien, mutta viimeistään tunnin kuluessa ja häviävät yleensä viimeistään joidenkin tuntien kuluttua (Haahtela ym. 2007).

Ensimmäistä vaihetta, jossa IgE-välitteinen allergia alkaa kehittyä, kutsutaan herkistymiseksi (Rindsjö ja Scheynius 2010). Atooppinen herkistyminen vie useimmiten joskus vain joitakin viikkoja, usein joitakin vuosia. Herkistyminen on mahdollista mm. ruoansulatuskanavan ja hengitysteiden limakalvojen kautta, mutta myös ihon kautta voi herkistyä. Limakalvo muodostaa rajapinnan kehon onteloiden ja ympäristön välillä ja sen tehtävänä on estää ympäristön mikrobien ja suurikokoisten molekyylien, kuten proteiinien, pääsy kudoksiin. Se ei ole kuitenkaan täysin läpäisemätön, joten pieniä määriä antigeenejä pääsee sen alle (Kansanterveyslaitoksen julkaisu 2007). Allergeenit tunkeutuvat tämän epiteliaalisen esteen lävitse (Rindsjö ja Scheynius 2010), jonka toimintaa ovat geneettiset ja ympäristötekijät voineet heikentää (Bieber 2008). Esimerkiksi geenivirhe filaggrini-proteiinissa, jolla on tärkeä rooli ihon epiteeliesteen toiminnan ylläpitämisessä johtaa sen toiminnan heikentymiseen, ja tämän on tutkimusten mukaan havaittu kasvattavan atooppisen ekseeman riskiä (Palmer ym. 2006). Atooppisesta herkistymisestä ei välttämättä vielä seuraa sairastumista eli oireita altistumistilanteessa, vaan sairastuminen tapahtuu yleensä vasta voimakkaan altistumisen seurauksena. On havaittu, että ihopistokokeen tai

verikokeen perusteella ympäristön tavallisille allergeeneille herkistyneistä vain puolella on selviä allergisia oireita (Haahtela ym. 2007).

Herkistymisen aiheuttaa elimistöön tunkeutuva vieras allergeeni, jonka antigeeniä esittelevät solut, dendriittisolut vangitsevat esimerkiksi hengitystien ontelossa tai hengitystien limakalvon epiteelissä. Allergeeni voi myös kulkeutua vaurioituneen epiteelin kautta submukosaalisiin dendriittisoluihin tai osa allergeeneistä, joilla on luontaista proteaasiaktiivisuutta voivat hajottaa epiteelisolujen välisiä tiiviitä liitoksia ja päästä sisään ja joutua edelleen dendriittisolujen poimimaksi. Dendriittisolut voivat reagoida sekä ulkopuolisiin patogeeneihin että jatkuvasti poimia elimistön omia antigeenejä ja harmittomia ympäristön proteiineja immuunitoleranssin kehittämiseksi (Rindsjö ja Scheynius 2010). Allergeenin sisäänsä ottaneet dendriittisolut kypsyvät ja siirtyvät paikallisiin imusolmukkeisiin tai paikalliselle limakalvolle, jossa ne esittelevät prosessoinnin jälkeen allergeenin (T-soluepitooppi) T-soluille interleukiini-4 (IL-4) ja IL-13 läsnäollessa (Galli ym. 2008, Galli ja Tsai 2012). Atooppisesti reagoivalla henkilöllä T-solut erilaistuvat Th2-tyypin (engl. T-helper) soluiksi ja alkavat lisääntymään ja tuottamaan välittäjäaineita (mm. sytokiineja), jotka suosivat B-solujen erilaistumista plasmasoluiksi (Haahtela ym. 2007). Plasmasolut tuottavat IgE-vasta-aineita, jotka leviävät paikallisesti ja siirtyvät imusuoniin ja myöhemmin verenkiertoon. Päästyään soluvälinesteseen allergeenille spesifiset tai ei-spesifiset IgE:t sitoutuvat kudosten syöttösolujen, basofiilien ja eosinofiilien sekä useiden muiden solujen pinnassa oleviin reseptoreihin (FcεRI, CD23 ja muut reseptorit). Kun uudelleenaltistuminen allergeenille tapahtuu sen sitouduttua kahteen vierekkäiseen spesifiseen IgE-molekyylisiin B-soluepitooppiensa välityksellä, seuraa jo syntyneen solumuistin ansiosta paljon nopeampi, herkempi ja voimakkaampi vaste, joka aktivoi solut ja vapauttaa niistä histamiinia ja muita välittäjäaineita, kuten tryptaasia, prostaglandiineja, leukotrieenejä ja kemokiinejä. Välittäjäaineiden vapautumisen saa aikaan atooppiselle allergialle tyypilliset oireet. Reaktiossa aktivoituvat jossain määrin myös hitaan allergiareaktion solut, kuten T-lymfosyytit,

makrofagit ja monosyytit (Haahtela ym. 2007, Galli ym. 2008, Gould ja Sutton 2008, Ho ym. 2014).

## 1.2 Luonnonkumi

### 1.2.1 *Hevea brasiliensis* -kumipuu

Vaikka yli 2500 korkeampaa kasvia tuottaa luonnonkumia (Hayashi 2009, Aoki ym. 2014), valtaosa (99 %) maapallon kaupallisesti tuotetusta luonnonkumista (engl. natural rubber latex, NRL) saadaan Euphorbiaceae-perheeseen kuuluvan trooppisen parakautsupuun eli kumipuun, *Hevea brasiliensis*, maitiaisnesteestä (Yeang ym. 2002a). Kumipuu kasvaa parhaiten 20–28 °C:een lämpötilassa kosteassa ympäristössä. Nämä kasvuolosuhteet altistavat sen herkästi ympäristön mikro-organismeille, mutta puulla on tätä varten kehittynyt oma puolustusmekanisminsa, jolla se suojautuu sekä tunkeutuvilta patogeeneiltä että puuhun muodostuvilta haavoilta (Niggemann ja Breiteneder 2000). *Hevea brasiliensis* -kumipuu on peräisin Brasiliasta, mutta sen siemenet levisivät brittiläisen plantaasinomistaja Wickhamin mukana Aasiaan vuonna 1850 (Warshaw 1998). Nykyään kumipuun kaupallinen viljely keskittyykin pääasiassa kaakkois-Aasian maihin, joista tärkeimmät ovat Thaimaa, Indonesia ja Malesia (Yeang ym. 2002a).

Pääasiassa molekyyliarakenteesta sekä korkeasta molekyylipainosta (yli  $1 \times 10^6$  Da) johtuen kumipuusta saatava luonnonkumi, *cis*-1,4-polyisopreeni, on ylivertainen esimerkiksi raakaöljystä valmistettuun synteettiseen kumiin verrattuna (Cornish ym. 2004, Hayashi 2009). *Hevea brasiliensis* -kumipuun heikkoutena toisaalta on se, että ne ovat lähes kokonaan viljelysmetsissä kasvavia kloonipuita ja se onkin luultavasti yksi maailman geneettisesti kapea-alaisin viljelykasvi. Geneettisen diversiteetin puuttuminen tekee siitä erityisen alttiin mm. patogeeneille. *Hevea brasiliensis* -kumipuun ilmastovaatimukset myös rajoittavat sen viljelyn vain trooppisille alueille ja siksi, kaupallisesti tärkeän, luonnonkumia myös lauhkeilla

vyöhykkeillä tuottavan viljelykasvin löytyminen on ollut tutkimusten kohteena jo vuosia (Cornish ym. 2004).

### 1.2.2 Muita luonnonkumia tuottavia kasveja

Lukuisten, usein trooppisten kasvilajien tuottama luonnonkumi ei ole usein molekyylipainoltaan riittävä ja koska molekyylipaino korreloi vahvasti kumin laatuun (Swanson ym. 1979), se estää monien luonnonkumia tuottavien kasvien kaupallisen hyödyntämisen laadukkaiden tuotteiden valmistamiseksi. Yksi potentiaalinen luonnonkumin lähde, joka on lähimpänä viljelykasviksi jalostamista ja kaupallista tuotantoa on mm. Pohjois-Amerikassa ja Meksikossa kasvava puumainen autiomaapensas *Parthenium argentatum*, Guayule. Sen kumipartikkelit sisältävät parakautsupuulle identtistä *cis*-isopreeniä ja se voi tuottaa isoja määriä molekyylipainoltaan suurta, hypoallergeenista luonnonkumia (Siler ja Cornish 1994, Pan 1995, Siler ym. 1996, Mooibroek ja Cornish 2000, Hayashi 2009). Tämän Guayule-pensaan tuottaman luonnonkumin on osoitettu olevan myös erinomaisen joustavaa, kestävä ja elastista (Warshaw 1998). Vaikka pensaan tuottama luonnonkumi on rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan sopiva lääkinnällisten laitteiden kaupallisille raaka-ainemarkkinoille eikä siitä valmistettujen tutkimuskäsineiden ole havaittu aiheuttavan tyyppin I allergioita (Mooibroek ja Cornish 2000, Palosuo ym. 2011), kasvi ei kuitenkaan siedä pitkittyneitä lumisia talvia ja ankaria lämpötiloja, joita Amerikassa esiintyy, ja siksi myös muita vaihtoehtoisia luonnonkumia tuottavia kasveja on tutkittu (Cornish ym. 2004).

### 1.2.3 Lateksin koostumus

*Hevea brasiliensis* -kumipuun maitiaisneste eli lateksi muodostuu neljästä pääkomponentista: kumipartikkeleista, lutoideista (engl. lutoids), Frey Wyssling -partikkeleista ja sytosolista.

Kumipartikkelit, jotka muodostavat 25–45 % maitiaisnesteestä tilavuudesta (Kurup ja Fink 2001) koostuvat hiilivety *cis*-1,4-polyisopreeniketjuista, joita ympäröi

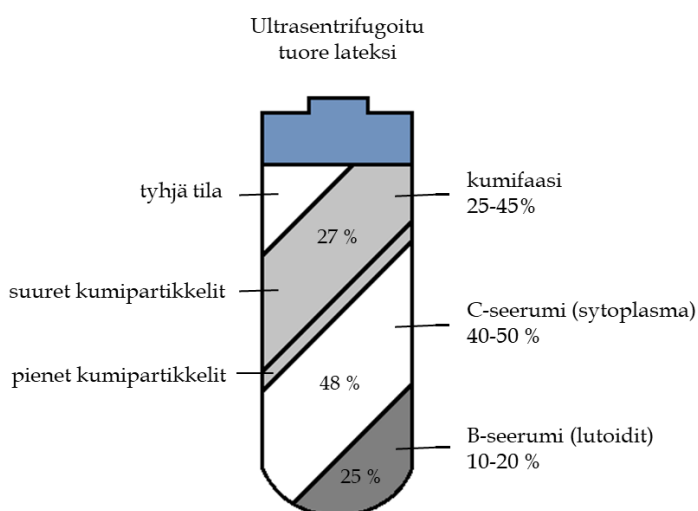
fosfolipoproteiinivaippa (Jacob ym. 1993). Rakenne (yli 99,5 % *cis*-sidospitoisuus) yhdessä muiden solukomponenttien kanssa saa aikaan luonnonkumin merkittävät fysikaaliset ominaisuudet, kuten kestävyden, elastisuuden, hankauksen ja iskunkestävyyden, tehokkaan lämpöhajonnan ja muokkautuvuuden kylmissä olosuhteissa (Cornish 2001, Hayashi 2009). Kaksi proteiinia, jotka ovat tärkeitä *cis*-1,4-polyisopreenisynteessissä, on tunnistettu ja sekvensoitu vuonna 1989. Toinen näistä, *cis*-prenyyylitransferaasi on hydrofobinen membraaniin sidottu entsyymi, joka katalysoi isopreeniyksiköiden lisäämistä ja aikaansaa tuhansia isopreeniyksiköitä pitkän polyisopreeniketjun syntymisen (Dennis ja Light 1989, Cornish 1993). Toinen, myös veteen liukenematon, ”rubber elongation factor”-entsyymi (REF) on 14,6 kDa kokoinen stabiloiva kofaktori, jota tarvitaan *cis*-prenyyylitransferaasin toiminnassa (Dennis ja Light 1989).

Lutoidien, jotka ovat pieniä solurakkuloita, osuus lateksin tilavuudesta on noin 10–20 %. Niillä on tärkeä merkitys lateksin koaguloitumisessa. Lutoidien pääproteiinit ovat heveiini (5 kDa) ja proheveiini (20 kDa) (Jacob ym. 1993), joskin pääosa rakkuloiden sisältämästä proteiinista, noin 70 %, on heveiiniä. Heveiinillä on merkittävä rakenteellinen homologia kasvien agglutiniinien (lektiinien) kanssa, joita esiintyy muun muassa vehnässä, ohrassa, riisissä ja perunassa (Lee ym. 1991). Lutoidien sisältämällä hevamiineilla (29 kDa), on homologiaa muiden kasvien, kuten viikunan ja papaijan lysotsyymien kanssa (Jekel ym. 1991).

Frey Wyssling -partikkelit muodostavat 2–3 % lateksin tilavuudesta, mutta niiden biologinen rooli ei ole vielä täysin selvä. Jäljelle jäävä sytosoli, joka kattaa 40–50 % lateksitilavuudesta, sisältää liukenevia hiilihydraatteja, orgaanisia happoja, aminohappoja, nukleotideja ja isopreenisynteessille tärkeitä proteiineja (Jacob ym. 1993).

Vaikka Moir (1959) pystyi erottamaan tuoreen lateksin ultrasentrifugoinnilla yhdeksään eri fraktioon, käytännössä lateksista voidaan erottaa kolme pääfraktiota: kumifaasi, C-seerumi ja lutoidien sisältämä B-seerumi (kuva 1). Lateksista noin 1–

1,5 % on proteiineja ja niiden määrä vaihtelee sentrifugoimalla eroteltujen pääfraktioiden välillä (Tata 1980). Lateksin kokonaisproteiinimäärään vaikuttavat niin geneettiset kuin kemialliset tekijät sekä metabolia. Myös mm. käytetyillä lannoitteilla ja kemiallisilla stimulanteilla sekä maaperän koostumuksella voidaan katsoa olevan vaikutusta lateksin proteiinimäärään (d'Auzac ja Jacob 1989).



Kuva 1. Lateksin proteiinien erottelu ultrasentrifugoinnilla ja proteiinien jakautuminen eri kerrosten välillä.

Kumifaasin proteiinit (27 %) ovat yleisesti veteen liukenemattomia, kun taas C- ja B-seerumin (48 % ja 25 %) ovat pääasiassa vesiliukoisia. Vesiliukoisten proteiinien osuus lateksin proteiineista on noin 70 %, loppuosan ollessa membraaneihin kiinnittyneinä (Yeang ym. 2002a, Yip ja Cacioli 2002). Lateksin C-seerumi sisältää suuren joukon proteiineja, jotka osallistuvat solun metaboliaan. Samoin lateksille tyypillisiä entsyymejä, jotka liittyvät kumin biosynteesireittiin, tavataan C-seerumissa. C-seerumissa arvioidaan olevan lukuisia, mahdollisesti satoja proteiineja. C-seerumiin verrattuna, B-seerumi sisältää huomattavasti vähäisemmän määrän proteiineja, alle 20 pääpeptidiä, heveisiin osuuden ollessa koko B-seerumin liukoisista proteiineista 50-70 % (Yeang ym. 2002a). C-seerumin proteiinit ovat yleisesti happamia, mutta B-seerumi sisältää sekä happamia että emäksisiä proteiineja (Moir ja Tata 1960).

Pohjafraktio sisältää pääasiassa lutoideja, mutta myös vähäisempiä organelleja, esimerkiksi ribosomeja ja solulimakalvostoa sekä Frey Wyssling -partikkeleita (Mengumpun ym. 2008), esiintyy joukossa. Lutoidit ovat pyöreitä, kooltaan 0,5–3 µm ja 8 nm paksuiseen osmosensitiiviseen membraaniin sitoutuneita partikkeleita. Varsinainen B-seerumi saadaan kerättyä talteen, kun sentrifugoinnilla saatu lutoideja sisältävä alimmainen pohjafraktio (engl. bottom fraction) kohdistetaan useille peräkkäisille jäädytys-sulatus -sykleille lutoidien hajottamiseksi ja sitä seuraavalla sentrifugoinnilla B-seerumin sisältävä supernatantti erottuu pellettiin jäävistä pohjafraktion membraaneista ja muista yhdessä saostuvista materiaaleista (Mengumpun ym. 2008).

#### 1.2.4 Lateksin keräys ja tuotteiden valmistusprosessi

*Hevea brasiliensis* -kumipuun viljelyssä sadonkorjuun saavuttaminen kestää noin 6–8 vuotta (Hamann 1993). Maitiaisnesteen keräystä varten puunkuoreen tehdään spiraalimainen ura, ja tätä prosessia, jossa maitiaisneste valuu puun runkoa pitkin, kutsutaan juoksuttamiseksi. Kumipuu tuottaa 100–200 ml lateksia kolmessa tunnissa. Juoksuttamalla, joka yleensä toistetaan joka toinen tai kolmas päivä, saadaan joka vuosi kerättyä luonnonkumia jopa 2500 kg hehtaaria kohden (Rose ja Steinbüchel 2005). Kumipuun maitiaisneste on oikeastaan puun kuoren ja nilan välissä olevien putkimaisen verkoston muodostavien laticiferi-solujen (engl. laticifer) solulimaa. Kun puunkuoreen tehdään viilto, näiden erikoistuneiden kasvisolujen maitomainen sytoplasma vapautuu ja se valuu talteen runkoon kiinnitettyihin keräyskuppeihin (kuva 2). Sytoplasman sisältämät sytosoli, kumipartikkelit ja lutoidit osallistuvat kaikki puuhun tehdyn haavan paranemisprosessiin (Niggemann ja Breiteneder 2000).





Kuva 2. Lateksin juoksutus kumipuusta. Lisenssi [CC BY-NC-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), kuvaaja Tony Rodd ([https://www.flickr.com/photos/tony\\_rodd/3243870610/](https://www.flickr.com/photos/tony_rodd/3243870610/)).

Yksi ensimmäisistä laajasti käytetyistä luonnonkumituotteista oli hammasproteesit (Meade ym. 2002). Nykyään luonnonkumia käytetään yli 40 000 tuotteessa (Rolland ja O'Hehir 2008), mm. renkaissa, lääkinnällisissä laitteissa, leikkaus- ja tutkimuskäsineissä sekä erilaisissa teollisuus- ja kulutustuotteissa. Renkaiden osuus koko luonnonkumituotteiden teollisessa valmistuksessa on yli 50 % (Hayashi 2009).

Pieni osa, vain noin 10–20 % luonnonkumista kerätään talteen nestemäisessä muodossa. Nestemäisestä lateksista voidaan valmistaa upotustekniikalla mm. suojäkäsineitä, kondomeita, katetreja, tutteja, kiristysiteitä, Kofferdam-lateksisuoja ja ilmapalloja. Lateksin keräyksen yhteydessä siihen lisätään kemikaaleja, mm. ammoniumhydroksidia, formaldehydiä ja sinkkioksidia, estämään lateksin koaguloituminen, haurastuminen ja mikrobikasvu. Raaka lateksi konsentroidaan sentrifugoimalla, jonka jälkeen kumipitoisuus on noin 60 %. Ammoniakkilisäys toistetaan vielä sentrifugoinnin jälkeen estämään bakteerikasvua. Merkittävä määrä muuta kuin kumimateriaalin suuria kumipartikkeleita, kuten seerumin liukoisia ja liukenemattomia proteiineja,

hiilihydraatteja, lipidejä ja pieniä kumipartikkeleita poistetaan sentrifugointivaiheen aikana (Toraason 2000, Meade ym. 2002, Yip ja Cacioli 2002). Lateksi vaatii vielä yli neljän viikon kypsytyksajan, jonka jälkeen tätä ammonioitua lateksia käytetään valmistettaessa upotustekniikalla erilaisia tuotteita (Perrella ja Gaspari 2002). Ennen tuotteiden valmistusta, lateksiin lisätään vielä monia lisäaineita, kuten tensidejä, rikkiyhdisteitä, sinkkioksidia, vulkanoinnin kiihdyttimiä (tiuraamit, karbamaatit ja/tai merkaptoyhdisteet), antioksidantteja ja antiotsonantteja (difenyyliamiini, fenyleenidiamiini, fenolit) sekä muita kemikaaleja (Meade ym. 2002). Lateksin käsittelyprosessin aikainen ammoniointi ja lämpö denaturoivat proteiineja ja aiheuttavat niiden hydrolyysiä, jolloin natiivikonformaatio muuttuu proteiinien hajoamisen ja/tai aggregoitumisen vaikutuksesta (Beezhold ym. 1994, Perrella ja Gaspari 2002).

Upotusmenetelmässä valmistettävien tuotteiden muotoiset muotit voidaan kastaa koagulanttia (kalsiumnitraatti) sisältävään säiliöön, jonka jälkeen ne kastetaan edelleen kemiallisesti käsiteltyyn lateksiin. Muottilaite voidaan huuhtoa lateksin ollessa yhä kostea (esivulkanointihuuhtelu), jonka jälkeen se kuljetetaan uuniin 100–120 °C:een lämpötilaan (vulkanointi) ja edelleen huuhdellaan (jälkivulkanointihuuhtelu) ennen liukastusaineen lisäämistä (puuteri tai polymeeri) (Meade ym. 2002, Yip ja Cacioli 2002). Jälki- ja esivulkanointihuuhteluissa lateksia huuhdotaan runsaasti vedellä, jossa suurin osa lisätyistä kemikaaleista sekä proteiineista, mukaan lukien B- ja C-seerumin sisältämiä hydrofiilisiä eli vesiliukoisia lateksiproteiineja, huuhtoutuu pois. Tästä huolimatta lopputuotteisiin jää proteiineja ja polypeptidejä sekä mm. useita hydrofobisia proteiineja (Yip ja Cacioli 2002, Mengumpun ym. 2008). Huuhteluprotokolla optimoimalla on saavutettu tuloksia, joissa mahdollisimman paljon liukoisista allergeenisistä proteiineista on päästy eroon (Yip ja Cacioli 2002). Vulkanoinnissa, joka on kumituotteiden valmistuksen tärkein vaihe, isopreenimolekyyliketjut silloitetaan kuumuuden ja rikin avulla verkkomaisen rakenteen muodostamiseksi ja tuotteen joustavuuden aikaansaamiseksi. Suojakäsineitä valmistettaessa käsinemuotit

voidaan edelleen upottaa puuterilietteeseen (maissitärkkelys) tai vaihtoehtoisesti puuterittomien käsineiden ollessa kyseessä kohdistaa kloorauskäsittelylle (Meade ym. 2002). Proteiinit, jotka vapautuvat lateksista, kiinnittyvät maissitärkkelyspuuteriin käsineen kuivuessa ja voivat edelleen siirtyä ilmaan, kun käsineitä puetaan ja riisutaan (Toraason 2000, Meade ym. 2002).

Suurimman osan kumipuusta kerätystä lateksista annetaan koaguloitua ja siitä prosessoitua kuivaa kumimateriaalia käytetään mm. renkaiden, autonosien, koneenosien, kotitaloustarvikkeiden, letkujen, hihnojen, tiivisteiden, jalkineiden, pullonkorkkien ja ruiskujen valmistuksessa (Breiteneder ja Scheiner 1998, Yip ja Cacioli 2002). Lateksin koaguloituminen aikaansaadaan alentamalla pH välille 4,5–6 muurahais- tai etikkahappoa lisäämällä. Kiinteään raakakumiin eli koaguloituneeseen lateksiin sekoitetaan erilaisia kemikaaleja. Myöhempään tuotteen valmistustapakohtaiseen prosessivaiheeseen voi liittyä muovausta, ruisku- ja suulakepuristusta sekä mankelointia. Vulkanointi suoritetaan 140–160 °C:een lämpötilassa (Yip ja Cacioli 2002). Valmistusprosessin aikaiset pesut ja mekaaninen käsittely saavat proteiinipitoisuuden alenemaan 50 % luonnonkumin kokonaisproteiinimäärään verrattuna (Niggemann ja Breiteneder 2000).

Nämä kaksi erilaista luonnonkumituotteiden valmistusprosessia johtavat erilaisiin allergeenisten proteiinien pitoisuuksiin ja ilmenemisiin lopputuotteissa. Riippuen lähtömateriaalista tai valmistusprosessista ja sen aikaisista käsittelyistä, lopputuotteiden proteiini- ja allergeenipitoisuudet voivat erota merkittävästi (Yip ja Cacioli 2002). Kuivakumituotteet sisältävät erittäin vähän lateksiproteiineja upotusmenetelmällä, ns. pehmeäkumista valmistettuihin tuotteisiin verrattuna, mutta niissä on suhteellisesti enemmän kumipartikkeleihin sitoutuneita proteiineja (Rolland ja O’Hehir 2008). Kuivakumimateriaalin ja -tuotteiden matala proteiinipitoisuus johtuu pääasiassa prosessointivaiheista, jossa proteiinit joko muuttunut liukenemattomiksi koaguloitumisessa käytetyn hapon takia, huuhtoutuvat pois laajoissa ja jatkuvissa pesuissa tai vähenevät korkeassa lämpötilassa tapahtuvan kuivumisen tai muiden prosessin aikaisten vaiheiden

takia (Yip ja Cacioli 2002). Yip ym. (1995) eivät tutkimuksessaan havainneet kuivakumissa ja siitä valmistetuissa tuotteissa merkittävää allergeenisuutta. Pehmeäkumituotteiden valmistuksessa käytettävät matalammat lämpötilat ja lyhyemmät lämpövulkanointivaiheet aiheuttavat oletettavasti lopputuotteen korkeamman allergeenipitoisuuden kuivakumituotteisiin verrattuna (Charous ym. 2002). Tutkimukset ovat osoittaneet myös, että puuteroiduissa käsineissä on merkittävästi korkeampi allergeenipitoisuus kuin puuterittomissa, ja tutkimuskäsineet sisältävät suuremman määrän allergeeneja kuin leikkauskäsineet (Koh ym. 2005). Vastaavasti puuteroidut tutkimuskäsineet tuottivat suuremman määrän ilmaan leviäviä allergeeneja kuin vastaavat leikkauskäsineet (Brown ym. 2004).

### **1.3 Luonnonkumiallergia**

Luonnonkumiallergia eli lateksiallergia voi välittyä sekä tyypin I että tyypin IV allergiamekanismeilla. Nopeaa IgE-välitteistä allergiaa aiheuttaa herkistyminen luonnonkumituotteiden sisältämille allergeenisille proteiineille tai peptideille (Turjanmaa ym. 1996), kun taas hitaan soluvälitteisen allergian aikaansaa pääasiassa tuotantoprosessissa käytetyt lukuisat kemikaalit ja niiden jäämät, kuten tiuraamit, karbamaatit, amiinit ja merkaptoaineet (Toraason 2000, Kurup ja Fink 2001, Haahtela ym. 2007, Rolland ja O'Hehir 2008). Merkille pantavaa muihin tyypin I allergioihin verrattuna ja joka tekee luonnonkumiallergiasta monimutkaisemman, on se, että allergia ei johdu vain yhdestä proteiinista vaan useista tunnetuista luonnonkumin allergeeneista. Proteiinien suhteellinen osuus luonnonkumissa sekä lopputuotteissa lisäksi vaihtelee merkittävästi (Yeang 2004) ja monet luonnonkumiallergisimmista potilaista ovat herkistyneet useammalle kuin yhdelle allergeenille (Yeang ym. 2000).

Altistuminen luonnonkumin allergeeneille voi tapahtua joko suoran kontaktin kautta (iho, limakalvo, sisäelin) tuotemateriaalin kanssa tai ilmajälitteisesti hengitettäessä puuteroiduista lateksikäsineistä tai muista jauhemaista materiaalia

sisältävistä tuotteista, kuten ilmapallot, ilmaan levinneitä puuterihiukkasia, joihin on sitoutunut allergeeneja (Vandenplas ja Raulf 2017).

### 1.3.1 Historia

Ensimmäiset havainnot luonnonkumiallergiasta saatiin Euroopassa, kun Stern (1927) havaitsi kumisten hammasproteesien sekä Nutter (1979) ja Förström (1980) lateksisten talouskäsineiden aiheuttavan kosketusnokkosihottumaa. Luonnonkumituotteiden yhteys IgE-välitteisten allergisten reaktioiden aiheuttajana ja merkittävänä työperäisenä sairautena tunnistettiin vasta kunnolla 1980-luvulla, kun terveydenhuollossa alettiin käyttämään merkittävässä määrin lateksikäsineitä suojauttaessa HIV- ja hepatiitti-infektioilta (Rolland ja O'Hehir 2008). Lateksikäsineiden yleistymisen myötä valmistajien määrä kasvoi merkittävästi ja luonnonkumin tuotantoprosesseissa tapahtui sellaisia muutoksia, jotka saattoivat osaltaan vaikuttaa myös luonnonkumiallergian yleistymiseen (Ownby 2002). On arveltu, että kerätyn luonnonkumin nopeampi prosessointi valmiiksi tuotteiksi ja toimitus asiakkaille huomattavasti nopeammin kuin ennen johti suurempaan lopputuotteiden allergeenimäärään, kun tuotteiden sisältämät proteiinit eivät ehtineet hajoamaan lyhyemmän säilytysajan aikana. Myös tiheampi lateksin juoksuttaminen ja kasvihormonien käyttö saattoivat vaikuttaa erityisesti mahdollisten allergeenisten kumipuun puolustusjärjestelmään liittyvien proteiinien määrän kasvuun (Vandenplas ja Raulf 2017).

1990-luvun kuluessa luonnonkumiallergia saavutti valtavat mittasuhteet ja johti voimakkaiseen ehkäisytoimenpiteisiin (Vandenplas ja Raulf 2017). 1990-luvun alkupuolella havaittiin myös, että lateksiproteiinit voivat sitoutua suojakäsineiden sisältämään maissitärkkelyspuuteriin (Turjanmaa ym. 1990). Luonnonkumiallergian nopea yleistymisen sekä maailmanlaajuisten tutkimusten kautta saadut havainnot allergisoivista tuotteista, riskiryhmistä, altistumisreiteistä sekä allergiaa aiheuttavien proteiinien molekyyli-tason ominaisuuksista ja immunologisesta vasteesta johti nopeasti tarpeeseen kehittää ja ottaa käyttöön

tuotteiden allergeenipitoisuuksien mittaamenetelmiä (Palosuo ym. 2011) sekä muuta *in vitro* ja *in vivo* -diagnostiikkaa ja hoitomuotoja (Rolland ja O'Hehir 2008). Suomessa vuodesta 1994 alkaen joka toinen vuosi toteutetut laajat markkinavalvontatutkimukset markkinoilla olevista useiden valmistajien eri käsintyypeistä ja niiden allergeenipitoisuuksista ja -tasoista mahdollisti Suomessa allergeenittomien tai hyvin matala-allergeenisten käsineiden valinnan ja käytön terveydenhuollossa (Fimean julkaisu 2005, Palosuo ym. 2011).

Vuosituhanne vaihteen aikoihin luonnonkumiallergioiden määrä pieneni selvästi mm. sellaisten tuotteiden, erityisesti tutkimus- ja leikkauskäsineiden, valmistusprosessien kehittymisen myötä, joissa herkistymistä ja allergisia reaktioita aiheuttavien luonnonkumiallergeenien pitoisuuksia saatiin minimoitua. Käsineiden proteiinipitoisuutta saatiin prosessiteollisuudessa vähennettyä uusien valmistustapojen käyttöönoton ansiosta, mm. huuhteluprotokollien optimoinneilla, säteilytyksellä, kemiallisilla tai entsyymaattisilla käsittelyillä sekä kloorauksella ja polymeeripinnoituksella (Baur ym. 1997, Yip ja Cacioli 2002, Beezhold ym. 2003). Merkittävä edistysaskel saavutettiin, kun luonnonkumiallergian erityiseen riskiryhmiin kuuluvia, monia kirurgisia toimenpiteitä syntymästä lähtien läpikäyneitä operoitiin täysin luonnonkumivapaasti ensihetkestä alkaen, jolloin potilaat eivät enää herkistyneet tuotteiden allergeeneille. Puuterittomien käsineiden käyttöönotto terveydenhuoltosektorilla johti ilmaan joutuvien ja siinä leviävien luonnonkumin allergeenien määrän sekä allergisten sairauksien merkittävään vähenemiseen (Palosuo ym. 2011).

Myös muista materiaaleista valmistettujen käsineiden yleistymisen on vaikuttanut suotuisasti luonnonkumiallergian kehittymiseen, vaikka niiden ominaisuudet, kuten vahvuus, kestävyys, elastisuus, tuntoherkkyyden säilyminen, käytön mukavuus, istuvuus ja biologinen hajoaminen eivät ole yhtä hyvät kuin lateksikäsineissä, ja siksi niiden käyttö terveydenhuollossa voi olla yhä tarpeen – varsinkin niiden kohdalla, jotka eivät vielä ole luonnonkumille herkistyneitä (Yip ja Cacioli 2002, Palosuo ym. 2011). Muista materiaaleista valmistetut

”proteiinivapaat” tuotteet eivät kuitenkaan estä sellaisten tyyppin IV allergioiden syntymistä, jotka johtuvat tuotteiden sisältämistä kemikaaleista (Yip ja Cacioli 2002). Sairaaloissa noin 50 % tuotteista on luonnonkumia sisältäviä (Warshaw 1998), joten se voi aiheuttaa myös omat haasteensa täysin lateksittomaan ympäristöön siirtymisessä.

Luonnonkumiallergia on hyvä esimerkki uudesta allergiasta, joka ilmaantuu yhtäkkiä ja jolla on valtavan suuri terveydellinen ja taloudellinen merkitys, mutta joka toisaalta suhteellisen lyhyellä ajanjaksolla saadaan lähes häviämään tuloksetta allergioiden välttämiseen perustuvalla torjuntastrategialla (Raulf 2014). Vaikka teollistuneissa länsimaissa, erityisesti terveydenhuollon ympäristössä on tehokkailla toimilla ja lainsäädännöllä saatu herkistyminen varsinkin pehmeäkumisten tuotteiden allergeeneille vähenemään ja luonnonkumiallergian epidemiahuippu on ohitettu jo aikaa sitten, voi allergia jäädä merkittäväksi huolenaiheeksi tietyissä maissa tai muiden kuin terveydenhuollon ammattiryhmien keskuudessa (Rolland ja O’Hehir 2008). Laajoilla epidemiologisilla tutkimuksilla on osoitettu, että tämä huoli liittyy erityisesti kehittyviin maihin (Wagner ja Breiteneder 2005, Vandenplas ja Raulf 2017). Teollistuvissa maissa, joissa on yhä laajemmin alettu ottamaan käyttöön kertakäyttöisiä luonnonkumituotteita eikä yhtä tiukkaa luonnonkumituotteiden tai -allergeenien välttämistä, jossa lainsäädäntö ja terveysviranomaiset velvoittaisivat esimerkiksi matala-allergeenisten, matalaproteiinisten ja puuterittomien lääkinnällisten suojakäsineiden käyttöä samalla tavalla kuin monissa muissa maissa, vielä välttämättä ole, on huoli aiheellinen. Myös lukuisat kulutustavarat sisältävät luonnonkumia, mutta niiden allergeenisuuden kontrollon puuttuminen on vielä laajasti tutkittu eikä vastaavaa sääntelyä niiden allergeenisuuden kontrolloimiseksi ole, joten ne voivatkin olla riski varsinkin sellaisille yksilöille, jotka ovat jo herkistyneet (Turjanmaa ja Mäkinen-Kiljunen 2002). Gathen ym. (2017) tutkivat sekä kotitalouden erilaisia luonnonkumituotteita että markkinoilla olevia tutkimuskäsineitä ja havaitsivat, että molemmista löytyi mitattavia määriä

luonnonkumin allergeeneja, joistakin kulutustavaroista jopa huomattavia määriä, mm. ilmapallot ja kondomit. Myös tietyt säännöllisesti yhä käytettävät luonnonkumituotteet, kuten katetrit voivat yhä altistaa erityiseen riskiryhmään kuuluvia lapsia (Rolland ja O'Hehir 2008).

### 1.3.2 Riskiryhmät ja -tekijät sekä yleisyys

Useiden pääasiassa suomalaisten tutkimusten perusteella tyypin I lateksiallergian yleisyys tavallisen väestön keskuudessa on alle 1 % (Liss ja Sussman 1999). Suurimman yksittäisen riskiryhmän herkistymiselle ja kliinisen allergian kehittymiselle muodostavat terveydenhuollon henkilökunta, sillä he käyttävät säännöllisesti luonnonkumista valmistettuja tuotteita. Allergiariski heidän kohdallaan on vaihdellut korkeimmillaan noin 3–17 %:n välillä. Muita ryhmiä, joissa käytetään erityisesti lateksikäsineitä, ovat mm. elintarvike-, kemian- ja lääketeollisuuden, kasvihuoneiden ja käsinetehtaiden työntekijät, kotitaloushenkilökunta ja kampaajat (Alenius ym. 2002, Vandenplas ja Raulf 2017). Heillä sairastumisriski on 5–11 %:n luokkaa. Spina bifida (synnynnäinen selkärangan kehityshäiriö, selkärankahalkio) -lapset sekä muita synnynnäisiä poikkeamia saaneet lapset ja aikuiset, jotka vaativat lukuisia kirurgisia operaatioita ja siten toistuvasti altistuvat erilaisille lääkinnällisille luonnonkumia sisältäville laitteille (käsineet, katetrit, suntit eli ihonalaiset letkut) kuuluvat korkean riskin ryhmään, joille voi kehittyä luonnonkumiallergia. Luonnonkumiallergian yleisyys tällaisilla lapsilla on 23–65 % (Alenius ym. 2002). Erityisesti sunttijärjestelmien käytön on havaittu aiheuttavan Spina bifida -lapsilla korkeamman allergiariskin (Niggemann ja Breiteneder 2000). Myös atopia ja käsi-ihottuma on säännöllisesti yhdistetty luonnonkumiallergian riskitekijöihin, kuten myös ruoka-allergia (Liss ja Sussman 1999). Luonnonkumiallergisilla terveydenhuollon työntekijöillä on atopia selvästi yleisempää kuin työntekijöillä, joilla ei ole havaittu luonnonkumiallergiaa. Käsi-ihottumaa esiintyy jopa 82 %:lla luonnonkumiallergisista aikuisista (Alenius ym. 2002). Eräässä tutkimuksessa 75 % lapsista, jotka olivat saaneet positiivisen tuloksen lateksialtistuskokeesta, oli atooppista ihottumaa. Altistusiällä, -ajalla



ja -tavalla sekä toistumistiheydellä on havaittu muun muassa olevan myös vaikutus herkistymiseen ja allergisen sairauden puhkeamiseen (Niggemann ja Breiteneder 2000). Nykyisin, kun on alettu noudattamaan tiukkaa luonnonkumipolitiikkaa ja tuotteet ovat korvautuneet sekä kokonaan lateksittomilla sekä puuterittomilla ja matala-allergeenisilla tuotteilla, on todellinen tyypin I lateksiallergian esiintyvyys terveydenhuollon työntekijöillä, erityisesti Euroopassa, laskenut alle 1 %:iin ollen näin samalla tasolla koko väestön keskuudessa. On kuitenkin muistettava, että tiettyjen riskiryhmien, kuten atooppisten, hedelmäallergisten ja lukuisia operaatioita syntymästään lähtien läpikäyneiden yksilöiden kohdalla luvut voivat olla huomattavasti korkeammat (Palosuo ym. 2011). Tyypin IV lateksiallergioiden yleisyydestä ja sen muutoksista ei ole samanlaista tutkimustietoutta kuin tyypin I allergioista, mutta sen yleisyyden on arvioitu olevan 1 % (Sommer ym. 2002). Oletettavasti valmistusprosessien aikaisten huuhteluiden optimointi on vaikuttanut allergeenisten proteiinien lisäksi myös kemikaalien määrän vähenemiseen. Kuten tyypin I tapauksessa, tyypin IV allergian riskitekijöihin liittyy myös sekä atopia että käsi-ihottuma (Palosuo ym. 2011).

### 1.3.3 Oireet

Lateksikäsineiden tiedetään aiheuttavan tyypin IV allergista kosketusihottumaa, jota aiheuttavat ihon kanssa kosketuksiin joutuvat kumikemikaalit, ja joka ilmenee eriasteisina iho-oireina, mm. hilseilevänä ihottumana noin 48–72 h jälkeen kontaktista (Toraason 2000, Kurup ja Fink 2001). Kumikemikaaliallergia voi myös kroonistua ja kehittää valoyliherkkyyden (Haahtela ym. 2007). Tyypin IV reaktioita voi ilmetä myös muiden kemikaalien yhteydessä, joita käytetään ennen suojakäsineiden käyttöä. Tällaisia ovat hajusteet, voiteet ja puhdistustuotteet. Nykyisin laajassa käytössä olevat alkoholipitoiset käsihuuhteet voivat pahentaa tyypin IV reaktioita (Palosuo ym. 2011).

Lateksimateriaalin valkuaisaineet voivat aiheuttaa laajan kirjon nopeita tyypin I IgE-välitteisiä yliherkkyydsreaktioita luonnonkumiallergisilla yksilöillä aina

miedosta nokkosihottumasta laajaan allergiseen turvotukseen (angioedeema) sekä henkeä uhkaavaan äkilliseen allergiareaktioon (anafylaksia). Reaktiot voivat olla paikallisia tai koko kehoon vaikuttavia (systeminen allerginen reaktio) (Vandenplas ja Raulf 2017). Ensimmäiset havainnot leikkauskäsineiden aiheuttamista äkillisistä allergiareaktioista raportoi Turjanmaa ym. (1984). Näitä reaktioita on ilmennyt muun muassa herkistyneille potilaille tehtyjen leikkausten aikana. Myös luonnonkumituotteiden aiheuttamista kuolemantapauksista on raportoitu (Toraason 2000). Äkillisiä allergiareaktioita on pääasiassa esiintynyt luonnonkumituotteen joutuessa limakalvon kanssa kosketuksiin (Tomazic ym. 1992), joten vakavia reaktioita harvoin tapahtuu suoran ihokosketuksen kautta, sillä ehjä orvaskesi estää useimmiten allergeenisen proteiinin pääsyn syvemmälle elimistöön (Warshaw 1998). Lievissä nokkosihottumareaktioissa esiintyy iholla tai limakalvolla paikallista kutinaa, punoitusta ja turvotusta, ja oireet häviävät melko nopeasti allergeenialtistumisen jälkeen. Limakalvo-, sisäelin- ja suonensisäisen lateksialtistuksen tiedetään kohottavan merkittävästi riskiä saada useita koko kehoon vaikuttavia reaktioita. Luonnonkumiallergiaan liittyy myös kaksi huomattavaa kliinistä ominaispiirrettä: ristireaktiot ruoka-allergeenien kanssa (lateksi-hedelmä-oireyhtymä) sekä työperäinen allerginen nuha ja silmäoireet (rinokonjunktiviitti) ja työperäinen astma työympäristössä esim. lateksikäsineille altistuneilla henkilöillä. Lateksi-hedelmä-oireyhtymän oireet vaihtelevat oraalisesta allergiaoireyhtymästä, joka ilmenee suun ja nielun kutinana ja/tai turvotuksena aina allergiseen nuhaan ja silmäoireisiin, allergiseen turvotukseen ja äkilliseen allergiareaktioon (Vandenplas ja Raulf 2017). Jo 1990-luvun alussa havaittiin, että luonnonkumituotteista ilmaan leviävät allergeenit voivat aiheuttaa allergista nuhaa ja astmaa (Turjanmaa ym. 1990).

#### 1.3.4 Diagnosointi ja hoito

Tyyppin I allergioiden diagnosointi ja hoito perustuvat pääasiassa seerumissa olevan IgE:n mittaamiseen ja vähentämiseen.

Allergiadiagnoosi perustuu potilaan kliiniseen historiaan, ihokokeeseen, seerumin IgE-vasta-aineiden mittaamiseen ja altistuskokeisiin. Huolellinen oirekuvan havainnointi on tärkeää, mutta luonnonkumiallergia tulee lähes aina vahvistaa vielä *in vivo* ja/tai *in vitro* -allergiatestillä. Ihopistokokeella (prick-testi) voidaan luotettavasti diagnosoida herkistyminen luonnonkumille ja sitä pidetään luotettavimmista diagnoosimenetelmistä luonnonkumiallergian määrittämisessä (Turjanmaa 2001, Wagner ja Breiteneder 2005). Potilaan *in vitro* allergeeni-IgE-testit perustuvat seerumin allergeenispesifisten IgE-vasta-aineiden määrittämiseen erilaisilla serologisilla menetelmillä (ELISA, entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys ja RAST, radioallergosorbenttitesti). Myös erilaisia immuno-elektroforeettisia menetelmiä, kuten immunoblottausta, on käytetty IgE:tä sitovan proteiinin tunnistamiseksi (Turjanmaa ym. 1996, Toraason 2000).

Altistuskokeita käytetään diagnoosin varmistamiseksi, jos muut testit (ihopistokoe ja serologinen testi) ovat antaneet negatiivisen tai ristiriitaisen tuloksen, mutta oirehistorian perusteella on syytä epäillä luonnonkumiallergiaa (Hamilton 2002, Ranta ja Ownby 2004, Palosuo ym. 2011). Altistuskokeisiin lukeutuu ympäristöaltistus sekä käyttö- ja hengitystestit (Hamilton ym. 2002). Erityisellä lapputestillä voidaan varmistaa kumikemikaalien aiheuttama hidas tyyppin IV kosketusallergia (Hamilton ym. 2002, Haahtela ym. 2007).

Tyyppin I allergisen reaktion diagnostiikassa käytetyt allergeenivalmisteet on aiemmin tyyppillisesti tehty lateksikäsineistä uuttamalla tai raakalateksista, joka on sentrifugoitu ja joko ammonioitu (engl. ammoniated latex, AL) tai ei (engl. non-ammoniated latex, NAL). Valmistustavasta ja lähtömateriaalista riippuen allergeenien kokonaismäärä ja suhteelliset osuudet vaihtelevat huomattavasti valmisteesta toiseen, ja kaupallisesti saatavilla olevat voivat selvästi erota laboratorioiden itse valmistamista (Toraason 2000, Hamilton 2002, Hamilton ym. 2002, Palosuo ym. 2011). Ihopistokokeisiin ei ole yleisesti hyväksyttyä spesifistä menettelytapaa (Palosuo ym. 2011), mutta standardoituja allergeenivalmisteita, joita on käytetty, on Euroopassa kaupallisesti saatavilla joitakin, mm. Stallergènes,

ALK-Abelló ja Greer (Hamilton 2002, Hamilton ym. 2002, Yeang ym. 2006, Rolland ja O’Hehir 2008, Ebo ym. 2010). Jos omatekoisia valmisteita käytetään, on validointi tunnetulla testivalmisteella, esim. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA:n E8 ei-ammonioidulla lateksilla, välttämätöntä (Hamilton ym. 2002). Eurooppalaisessa allergeenivalmisteiden arviointitutkimuksessa vertailtiin viittä kaupallista luonnonkumin ihopistokoevalmistetta ja tulokset olivat yhtä valmistetta lukuun ottamatta samankaltaiset antaen valmisteiden herkkyudeksi 89 % ja spesifisyydeksi > 92 % (van Kampen ym. 2013). Vaikka serologisia seerumin IgE-testejä on kehitetty ja ne ovat yleisesti käytössä luonnonkumiallergian diagnostiikassa, mitään niistä ei ole hyväksytty laajasti yleiseen käyttöön, ja siksi niitä on kehitetty ristiriitaisten tulosten ja suhteellisen suurien väärin positiivisten ja väärin negatiivisten tulosten poistamiseksi (Palosuo ym. 2011). Monia *in vitro* -testejä on saatavilla myös kaupallisesti, mm. ImmunoCAP, AlaSTAT ja HyTECH (Hamilton ym. 1999, Toraason 2000, Hamilton 2002, Hamilton ym. 2002, Ebo ym. 2010, Palosuo ym. 2011, van Kampen ym. 2013).

Tärkeimpien lateksiallergeenien tunnistaminen ja niiden molekyyli-tason tuntemus edistävät luotettavampien *in vivo* ja *in vitro* -diagnostisten valmisteiden kehittämistä ja niiden käyttöä yksilöiden kliiniseen historiaan perustuvan luonnonkumiallergiaepäilyn varmistamisessa (Palosuo ym. 2007a). Yhdistelmä-DNA-tekniikalla on saatu tuotettua kloonatuista allergeeneista yhdistelmä- eli rekombinanttiallergeeneja, joita on hyödynnetty diagnostiikassa aiempien lähtömateriaalista valmistettujen epäluotettavien ja puhdistamattomien sekä karakterisoimattomien valmisteiden sijaan. Ennen kuin rekombinanttiallergeenien käyttö voidaan laajemmin hyväksyä, täytyy ne validoida natiiveilla proteiineilla allergeenireaktiivisuuden varmistamiseksi (Yeang ym. 2002a). Geenitekniikalla valmistetut yksittäiset rekombinanttiallergeenit eivät kuitenkaan aina sovellu allergeenitesteiksi tai hoitovalmisteiksi, sillä potilaat ovat voineet herkistyä usein pääallergeenin lisäksi sivuallergeenille tai jopa pelkästään yhdelle tai useammalle sivuallergeenille (Haahtela ym. 2007), joten tällöin haasteena on löytää kaikki ne

kliinisesti merkittävimmät allergeenit, jotka tulisi olla menetelmässä mukana. Eri allergeenien kyky ristireagoida toistensa kanssa asettaa myös omat haasteensa diagnostiikassa, kun positiivinen testituloks ei aina tarkoita, että potilas olisi herkistynyt luonnonkumin allergeeneille. Kliinisesti merkityksettömien väärien positiivisten tulosten on useasti havaittu johtuvan herkistymisestä ristireagoiville hiilihydraattideterminanteille (engl. cross-reactive carbohydrate determinant, CCD) tai panallergeeninä eli yleisallergeeninä tunnetulle profiiliinille (Ebo ym. 2010). Ebo ym. (2010) havaitsivat, että erityisellä CRD-mikrosirumenetelmällä (engl. component-resolved diagnosis), jossa käytettiin usean rekombinanttiallergeenikomponentin yhdistelmää, voitiin luotettavasti diagnosoida luonnonkumiallergia ja sen avulla oli myös mahdollista erottaa oikea allergia eli kliinisesti merkittävä herkistyminen oireettomasta herkistymisestä. Vastaavia tuloksia on saatu myös monissa muissa tutkimuksissa käyttämällä pääasiassa erilaisia rekombinanttiallergeenien, mutta myös luonnollisesti puhdistettujen natiiviallergeenien yhdistelmiä (Mari ym. 2007, Raulf-Heimsoth ym. 2007, Schuler ym. 2013, Raulf 2016).

Luonnonkumiallergiaa hoidetaan kuten muitakin allergioita, ja yksi tärkeimmistä hoitokeinoista liittyy allergeenin välttämiseen. Oireita voidaan lievittää antihistamiinilla ja kortikosteroideilla (Zellweger ja Eggel 2016). Äkillisten allergiareaktioiden hoitona käytetään ensihoitona adrenaliinia ja jälkireaktioiden vaimentamiseen kortikosteroidia ja antihistamiinia (Haahtela ym. 2007).

IgE-välitteisen allergian hoitomuotona voidaan käyttää myös siedätyshoitoa eli allergeenispesifistä immunoterapiaa (SIT). Tässä potilaalle annetaan toistuvasti ja hoidon jatkuessa yhä suurempia määriä allergeenivalmistetta tai rekombinanttiallergeenejä. Hoito kestää 3–5 vuotta, jotta sillä saavutetaan pitkäaikaisia vaikutuksia. Perinteisessä SIT-menetelmässä allergeenivalmiste annetaan ihonalaisena pistoksena (SCIT), mutta kielenalussiedätys (SLIT) on osittain korvannut sen turvallisempaa ja helpompaa vaihtoehtona (Zellweger ja Eggel 2016). Siedätyshoitoon liittyy aina allergisen reaktion riski, ja myös

huomattavia sivuvaikutuksia on raportoitu toteutetuissa luonnonkumiallergian hoitokokeissa (Rolland ja O'Hehir 2008). Vaikka SLIT-hoito joissakin kokeissa osoittautui turvalliseksi ja tehokkaaksi ja sivuvaikutuksia oli vähemmän SCIT-kokeisiin verrattuna, lisää kontrolloituja kokeita tarvitaan ennen kuin siedätyshoito voidaan hyväksyä luonnonkumiallergian hoitomuodoksi. Geeniteknologialla on mahdollista valmistaa puhdistetuista tai kloonatuista allergeeneista turvallisempia ja tehokkaampia siedätyshoitovalmisteita (Beezhold ym. 2001, Karisola ym. 2004, Rolland ja O'Hehir 2008), sillä kliinisissä kokeissa käytetty "raaka" puhdistamaton lateksivalmiste lisää merkittävästi riskiä jopa vakaville sivuvaikutuksille.

Anti-IgE-vasta-aineita, jotka estävät liukoisen IgE:n vuorovaikutuksen mm. syöttösolujen FcεRI-reseptorien kanssa, on kehitetty, ja laajasti käytetty Omalizumab on saanut vuonna 2003 Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (FDA) hyväksynnän allergisen astman hoitomuotona (Zellweger ja Eggel 2016). Omalizumab anti-IgE-vasta-ainetta on testattu myös luonnonkumiallergisten potilaiden hoidossa (Reunala ym. 2004).

### 1.3.5 Merkittävimmät luonnonkumin allergeenit

Luonnonkumi sisältää vähintään 200 erilaista proteiinia tai polypeptidiä, joista ainakin neljäsosan on havaittu sitoutuvan luonnonkumiallergisten potilaiden IgE-vasta-aineisiin (Kurup ym. 1996, Posch ym. 1997, Alenius ym. 2002). Allergeeni on joko merkittävä tai vähäinen allergeeni sen perusteella, onko testatuista potilaista joko yli tai alle 50 %:lla vastaavia allergeenispesifisiä IgE-vasta-aineita (King ym. 1995). Lisäksi se, onko allergeeni merkittävä tai vähäinen, riippuu allergisten yksilöiden populaatiosta, esimerkiksi tietty allergeeni voi olla merkittävä toiselle potilasjoukolle, mutta vain vähäinen toiselle. Myös maantieteellisellä sijainnilla voi olla tässä merkitystä (Bredehorst ja David 2001). Tähän mennessä viisitoista *Hevea brasiliensis* -kumipuusta eristettyä luonnonkumin allergeenia on tunnistettu ja karakterisoitu sekä molekyyli- että immunologisella tasolla, ja ne ovat saaneet allergeeniluokituksen (taulukko 1). Luonnonkumiallergiset henkilöt ovat voineet

herkistyä näistä joko yhdelle tai todennäköisemmin useiden allergeenien yhdistelmälle (Kurup ym. 2000, Bernstein ym. 2003). Puhdistetuilla ja/tai rekombinanttiallergeeneilla tehtyjen ihokokeiden sekä serologisten ja immunoblottianalyysien perusteella mikään näistä allergeeneista ei näyttäisi olevan vallitseva (Yeang ym. 2006).

Taulukko 1. *Hevea brasiliensis* -kumipuun luonnonkumiallergeenit (muokattu Kurup ja Fink 2001, Wagner ja Breiteneder 2005, Vandenplas ja Raulf 2017, <http://www.allergen.org>).

Allergeeni	Biokemiallinen nimi	MW (kDa)	Altistusreitti	Sijainti lateksissa	Kliininen merkitys	Referenssi
Hev b 1	"Rubber elongation factor" (REF)	14	kosketus	suuret kumipartikkelit	Merkittävä, SB	Czuppon ym. 1993, Alenius ym. 1993, Yeang ym. 1996, Rihs ym. 2000
Hev b 2	Beta-1,3-glukanaasi; glukaani endo-1,3-beta-glukosidaasi; emäksinen vakuoli-isoformi	35, 36,5 ja 38	kosketus	lutoidit	Epäselvä*	Sunderasan ym. 1995, Bernstein ym. 2003, Palosuo ym. 2007a
Hev b 3	Pieni kumipartikkeliproteiini	24	kosketus	pienet kumipartikkelit	Merkittävä, SB	Alenius ym. 1993, Yeang ym. 1998
Hev b 4	Lestinaasihomologi; GDSL lipaasi/ esteraasi-perheen jäsen	53-55	kosketus	lutoidit	Vähäinen*	Bernstein ym. 2003
Hev b 5	Hapan rakenneproteiini	16	kosketus	sytoplasma	Merkittävä, terveydenhuolto; tärkeä, SB	Akasawa ym. 1996, Slater ym. 1996, Bernstein ym. 2003
Hev b 6	Heveiini prekursori 6.01 proheveiini, 6.02 heveiini, 6.03 C-term. fragmentti	20, 4,7 ja 14	kosketus	lutoidit	Merkittävä, terveydenhuolto; tärkeä, SB	Alenius ym. 1995a, Banerjee ym. 1997
Hev b 7	Patatiinin kaltainen proteiini (esteraasi)	42	kosketus	sytoplasma	Vähäinen	Bernstein ym. 2003
Hev b 8	Profiliini	15	kosketus	sytoplasma	Vähäinen	Nieto ym. 2002
Hev b 9	Enolaasi	51	kosketus	sytoplasma	Vähäinen	Wagner ym. 2000
Hev b 10	Mangaanisuperoksididismutaasi (MnSOD)	26	kosketus	mitokondrio	Vähäinen	Rihs ym. 2001
Hev b 11	Luokan I kitinaasi	30	kosketus	sytoplasma	Vähäinen	O'Riordain ym. 2002
Hev b 12	Ei-spesifinen lipiditransferiproteiini, tyyppi 1 (nsLTP1)	9	kosketus	sytoplasma	Vähäinen	Beezhold ym. 2003
Hev b 13	Esteraasi	42	kosketus	lutoidit	Epäselvä*	Bernstein ym. 2003, Palosuo ym. 2007a
Hev b 14	Hevamiini	30	kosketus	lutoidit	Vähäinen*	Jekel ym. 1991, Alenius ym. 1995a
Hev b 15	Seriiniproteaasi-inhibiittori	7,5	kosketus		Vähäinen	Rihs ym. 2015

SB, *Spina bifida* -lapset

\* ei saatavilla rekombinanttiproteiiniina

Ei ole vielä täysin selvää, mikä on kaikkien luonnonkumin pääallergeenien kliininen merkitys. Ensimmäinen luonnonkumin allergeeni, jonka Czuppon ym. (1993) tunnistivat tutkimuskäsineistä valmistetusta uutteesta, oli hydrofobinen Hevb1-proteiini. Tämän ja toisen hydrofobisen Hevb3-proteiinin on osoitettu olevan merkittäviä allergeeneja *Spina bifida* (SB) ja muille synnynnäisiä epämuodostumia saaneille lapsille, jotka ovat syntymästään lähtien herkistyneet lateksi-proteiineille läpikäydessään lukuisia leikkauksia (Alenius ym. 1993, Alenius ym. 1995b, Yeang ym. 1996, Alenius ym. 2002). On myös kiistatonta, että Hevb5 ja Hevb6 (Hevb6.01 ja Hevb6.02) ovat merkittäviä allergeeneja aikuisille, mutta

tärkeitä myös *Spina bifida* tai muille luonnonkumiallergisille lapsille, sillä yli puolella herkistyneistä potilaista on havaittu seerumissa spesifistä IgE-vasta-ainetta (Akasawa ym. 1996, Alenius ym. 1996, Slater ym. 1996, Wagner ja Breiteneder 2005). Sen sijaan osan allergeenien merkitys on jäänyt epäselväksi. Tutkimusten perusteella on osoitettu, että Hevb2, Hevb13 ja mahdollisesti Hevb4 ja Hevb7 ovat merkittäviä allergeeneja aikuisille ja jopa *Spina bifida* -lapsille, jotka ovat herkistyneet luonnonkumille (Bernstein ym. 2003, Yeang 2004, Wagner ja Breiteneder 2005, Raulf-Heimsoth ym. 2007). Toisaalta Hevb2 ja Hevb13 -proteiinien ei ole toisissa tutkimuksissa todettu olevan merkittäviä allergeeneja aikuispotilaiden keskuudessa (Palosuo ym. 2004, Palosuo ym. 2007a).

Vaikka iso joukko luonnonkumin allergeeneja on puhdistettu sekä kloonattu ja tuotettu rekombinanttiproteiininä, ei kaikkien tunnettujen allergeenien käyttö luonnonkumiallergian diagnosoissa kliinisen herkistymisen osoittamiseksi ole välttämätöntä (Sussman ym. 2002). Ei ole täysin selvää mitkä näistä luonnonkumin allergeeneista kestävät ankaran kuminvalmistusprosessin immunologisesti aktiivisina molekyyleinä tai fragmentteina ja aiheuttavat yksilöiden herkistymistä. On myös mahdollista, että valmistusprosessissa syntyy uusia allergeenisia proteiineja tai IgE-epitoppeja (Palosuo ym. 2002). Luotettavien diagnostisten testien kehittämisen lisäksi on tarpeen tunnistaa myös lopputuotteista ne proteiinit tai peptidit, jotka voivat herkistymistä aiheuttaa. Suhteellisen vähäinen määrä allergeeneja on voitu tähän mennessä osoittaa yksiselitteisesti löytyvän valmiista lateksituotteista (Palosuo ym. 2007b). Ainakin Hevb1, 3, 5, ja 6.02 ja/tai niiden IgE-epitopit sisältävät fragmentit tai polymeerit voivat olla läsnä lopputuotteissa (Palosuo ym. 2002, Yeang ym. 2004). Muihin luonnonkumituotteista havaittavissa oleviin allergeeneihin lukeutuu myös Hevb2 ja Hevb13 (Yeang ym. 2002b, Yeang ym. 2004). Monia erilaisia spesifisiä, herkkiä, toistettavia ja standardoitavia testejä, joissa käytetään monoklonaalisia ja/tai polyklonaalisia vasta-aineita ja puhdistettuja tai rekombinanttiallergeeneja on kehitetty perinteisten testien rinnalle (Palosuo ym. 2002, Yeang ym. 2004, Tomazic-Jezic ym. 2004, Palosuo ym. 2007b),



jotta saadaan riittävä ja luotettava tieto lateksituotteen allergeenisesta potentiaalista. Palosuo ym. (2007b) havaitsivat, että kaupallisella suomalaisen biotekniikkayhtiön (FIT Biotech, Tampere) ja tutkijajoukon yhteistyönä kehittämällä ja vuonna 2001 markkinoille tulleella (Palosuo ym. 2011) kvantitatiivisella "capture"-EIA (entsyymi-immunoanalyysi) FITkit®-testillä oli mahdollista arvioida korkealla tarkkuudella ja herkkyydellä lääkinnällisten käsineiden allergeenista potentiaalia, kun vain neljää kliinisesti relevanttia allergeenia (Hevb1, 3, 5, ja 6.02) käytettiin allergeenisuuden mittarina. Varmuutta ei kuitenkaan ole mitkä muut allergeenit voivat merkittävästi vaikuttaa tuotteen kokonaisallergeenisuuteen.

### 1.3.6 Hevb2 ( $\beta$ -1,3-glukanaasi)

Yhdellä luonnonkumin allergeeneista, Hevb2-proteiinilla on  $\beta$ -1,3-glukanaasiaktiivisuutta. Kasvien monomeeriset  $\beta$ -1,3-glukanaasit (glukaani endo-1,3- $\beta$ -glukosidaasit, EC 3.2.1.39) muodostavat PR-2-proteiiniperheen (engl. pathogenesis-related). Näille proteiineille yleinen biokemiallinen piirre on niiden pieni molekyylikoko, stabiilisuus matalissa pH-olosuhteissa sekä kestävyys proteaaseja vastaan. Korkeammilla kasveilla näitä proteiineja muodostuu sekä patogeenisen mikrobi-invaasion että ympäristökuormituksen (haavat, fysikaalinen ja kemiallinen rasitus) vaikutuksesta (Hoffmann-Sommergruber 2000).  $\beta$ -1,3-glukanaasit katalysoivat sienten soluseinän tärkeän ja yleisimmän komponentin  $\beta$ -1,3-glukaanin (Wessels ja Sietsma 1981, Peberdy 1990) glykosidisen sidoksen hydrolyysiä heikentäen soluseinän mekaanista lujuutta ja aiheuttaen lopulta solun hajoamisen. (Boller 1987, Hong ja Meng 2003). Luokan I  $\beta$ -1,3-glukanaasit ovat solunsisäisiä emäksisiä entsyymejä, jotka sijaitsevat vakuoleissa eli kasvisolujen solunesterakkuloissa ja joista proteiinisynteesin translaatiossa muodostuu preproteiini. Entsyymi koostuu amino(N-)terminaalista signaalisekvenssistä sekä yhden N-glykosylaatiokohdan omaavasta karboksi(C-)terminaalista (Hoffmann-Sommergruber 2000).

Hevb2-proteiini on eristetty lateksin B-seerumin sisältävistä lutoideista. Churngchow ym. (1995) puhdistivat kaksi  $\beta$ -1,3-glukanaasin isoentsyymiä ioninvaihto- ja affiniteettikromatografialla ja määrittivät geelielektroforeesilla näiden monomeeristen proteiinien molekyylipainoiksi 32 ja 35 kDa. He havaitsivat, että molemmat ovat emäksisiä ja molekyylipainoltaan suurempi on myös glykoproteiini. Alenius ym. (1995a) puhdistivat B-seerumin proteiineja geelisuodatuksella ja käänteisfaasikromatografialla ja havaitsivat puhdistetulla noin 36 kDa:n proteiinilla olevan korkeaa homologiaa useiden kasvien endo-1,3- $\beta$ -glukosidaasien kanssa. Immunoblotissa 6/29 (21 %) luonnonkumiallergisen potilaan seerumista löytyi proteiinille spesifistä IgE-vasta-ainetta. Sunderasan ym. (1995) eristivät, tunnistivat ja karakterisoivat Hevb2-proteiiniksi nimetyn lateksiproteiinin ja saivat selvitettyä, että allergeenin pI on 9,5, N-terminaalinen pää on blokattu, proteiini kulkee geelielektroforeesissa 34 ja 36 kDa:n kokoisena duplettina ja 6/20 (30 %) luonnonkumiallergisen potilaan plasmassa/seerumissa on spesifistä IgE:tä. Lisäksi he valmistivat polyklonaalista vasta-ainetta käsineuutetta vastaan ja havaitsivat, että puhdistettu Hevb2-proteiini sitoutui spesifiseen vasta-aineeseen.

Chye ja Cheung (1995) julkaisivat kumipuun  $\beta$ -1,3-glukanaasientsyymin cDNA-sekvenssin, jonka perusteella proteiini koostuu 374 aminohappotähteen pituisesta polypeptidiketjusta. Tutkimuksesta saadut tulokset vahvistivat myös Subroton ym. (1996) johtopäätöksiä siitä, että valmiista 35,1 kDa:n kokoisesta proteiinista on poistettu N-terminaalinen signaalisekvenssi sekä C-terminaalinen vakuoli-kohdennussekvenssi (propeptidi). Sekvenssianalyysi osoitti myös proteiinin blokatun N-terminaalin, jossa on syklinen glutamiiniaminohappo. Myöhemmissä tutkimuksissa Subroto ym. (2001) havaitsivat eri *Hevea brasiliensis* -puukloonien välisen eron ei vain  $\beta$ -1,3-glukanaasien, mutta myös niihin sitoutuneiden hiilihydraattien määrissä. Tutkimusten perusteella eri kloonien  $\beta$ -1,3-glukanaasientsyymit voivat olla joko glykosyloituneita tai glykosyloimattomia tai niiden seoksia, kuten kloonissa RRIM600, ja toisaalta joissakin klooneissa

aminohappoketjussa voi olla kaksi eri glykosylaatiokohtaa asparagiinissa (Asn<sup>27</sup> ja Asn<sup>314</sup>) tai vain yksi (Asn<sup>27</sup>) (Subroto ym. 2001).

Yagami ym. (1998) eristivät ei-ammonioidusta lateksista anioninvaihtokromatografialla kolme blokatuksi havaitun Hevb2-proteiinin isomuotoa (35, 36,7 ja 38 kDa). Immunoblotissa sekä ELISA-analyysissa havaittiin puhdistetulle Hevb2-proteiinille spesifistä IgE-vasta-ainetta 6/15 (40 %) luonnonkumiallergisella potilaalla. Myöhemmin Yagami ym. (2002) osoittivat, että konkanavaliini A (ConA) -affiniteettipylväällä puhdistetusta proteiinista SDS-PAGE-geelin perusteella molekyylipainoltaan suurin isomuoto oli glykosyloitunut, kun taas pienempi koostui kahdesta isomuodosta, joista toinen oli glykosyloitunut ja toinen ei. He havaitsivat *in vitro* -kokeidensa perusteella glykaaniepitoppeiden merkityksen IgE:hen sitoutumisessa, vaikka eivät voineetkaan täysin poissulkea peptidiepitoppeiden roolia vasta-aineen tunnistamisessa, sillä peptidiepitopin konformaationaallinen (laskostunut, kolmiulotteinen) rakenne on herkempi denaturoiville koeolosuhteille kuin glykaanien. Glykosyloimaton Hevb2-isomuoto sitoutui spesifiseen IgE:hen, kun *in vitro* -koe suoritettiin vähemmän denaturoivissa olosuhteissa, ja pienellä potilasmäärällä (n=7) toteutetussa *in vivo* -ihopistokokeessa sen havaittiin vastaavasti antavan useammin positiivisen vasteen kuin glykosyloidut isomuodot. Monet näistä tutkimuksista ovat osoittaneet, että useat luonnonkumin Hevb2-homologit eroavat toisistaan sekä sekvenssiensä että proteiinisynteesin jälkeisissä modifikaatioissa muodostuneiden rakenteidensa osalta (Subroto ym. 1996, Subroto ym. 2001, Yagami ym. 2002).

Vihjeen glykaanien mahdollisesta IgE-epitoppiroolista vasta-aineen tunnistamisessa antoi tutkimus, jossa *Escherichia coli* -bakteerissa tuotettu Hevb2-rekombinattiproteiini sai aikaan *in vivo* -ihopistokokeessa positiivisen vasteen vain 2/29 (7 %) luonnonkumiallergiselle potilaalle. Varmuutta siitä, johtuiko huono vaste muutoksista proteiinin kolmiulotteisessa rakenteessa vai siitä, ettei bakteerisolu tue glykosylaatiota, ei kuitenkaan saatu (Yip ym. 2000). Heimsoth ym. (2007) osoittivat myöhemmin, että vaikka heidän aiemmin *E. coli* -bakteerissa

tuottama glykosyloimaton rekombinantti-Hevb2-proteiini ei kyennyt sitomaan spesifistä IgE:tä, IgE:hen sitoutuva epitooppi voi muodostua saman allergeenimolekyylin peptidi- ja hiilihydraattiepitoopista. Seifert ym. (2006) havaitsivat, että yksilön IgE:n sitoutuminen kohdistui joko Hevb2:n proteiini- tai hiilihydraattiepitooppiin, ja IgE:n tunnisti useammin proteiiniepitooppi henkilöllä, joka oli allerginen verrattuna henkilöön, joka ei ollut kliinisesti allerginen, mutta oli herkistynyt. Myöhemmissä tutkimuksissa on vahvistettu, että IgE:hen sitoutuva epitooppi voi olla glykoepitooppi ja/tai kahden epitoopin laskostunut yhdistelmä, jossa on sekä peptidi- että hiilihydraattirakenteita (Barre ym. 2009, Rodríguez-Romero ym. 2014).

Fuentes-Silva ym. (2007) puhdistivat Hevb2-proteiinin lutoideista geelisuodatus-, affiniteetti- ja kationinvaihtokromatografialla ja määrittivät kahden eri isomuodon glykaanipitoisuuksia ja -rakenteita. He saivat massaspektrometrisissä analyyseissä isomuotojen molekyylipainoiksi 38,4 ja 38,1 kDa, ja havaitsivat pienemmän proteiinin N-terminaalisen pään olevan blokattu. Rodríguez-Romero ym. (2014) osoittivat rakenneanalyyseillä myöhemmin, että 316 aminohappotähteestä koostuvalla molekyylipainoltaan pienemmällä, vähemmän glykosyloituneella entsyymillä on puolustukseen liittyville proteiineille tyypillinen N-terminaalinen pyroglutamaatti sekä kaksi glykosylaatiopaikkaa (Asn<sup>27</sup> ja Asn<sup>314</sup>), vaikka useissa Hevb2-isomuodoissa potentiaalinen glykosylaatiopaikka on vain Asn<sup>27</sup>. Näiden molempien aminohappotähteiden on aiemmassa tutkimuksessa osoitettu sijaitsevan kahdessa lineaarisessa peptidiepitoopissa, joka selittää havainnon siitä, että IgE:hen sitoutuva epitooppi voi sisältää myös hiilihydraattirakenteita (Barre ym. 2009). Rodríguez-Romero ym. (2014) havaitsivat tutkimiansa glykaanirakenteiden muodostuvan pääasiassa haaraisesta hyvin immunogeenisen Lewis<sup>x</sup>-tyypin kaltaisesta dekasakkaridista, jota on laajasti havaittu myös muilla kasviglykoproteiineilla, ja osoittivat sen tässä tulosten perusteella olevan tärkeä allergeeninen epitooppi.

Muista tunnistetuista lateksiallergeeneista poiketen Hevb2 on emäksinen proteiini, kun muut ovat happamia. Proteiini liukenee tutkimusten perusteella vain suurissa ionipitoisuuksissa (suola) ja saostuu, kun proteiiniliuosta laimennetaan tai dialysoidaan. On arveltu, että proteiini ei tämän takia huuhtoutuisi pois lateksikäsineiden valmistusprosessin aikaisissa pesuissa, mutta myöhemmin liukenesi hikeen, kun käsineitä käytetään (Sunderasan ym. 1995, Yeang ym. 2002a).

Hevb2-proteiinin allergeenisesta luonteesta on julkaistu ristiriitaisia tuloksia. Toiset tutkimukset ovat osoittaneet sen merkittäväksi allergeeniksi, kun taas toisissa sen kliininen merkitys on ollut vähäinen.

Useat *in vitro* tai *in vivo* -kokeet ovat osoittaneet sen merkittäväksi allergeeniksi. Kurup ym. (2000) havaitsivat 48–65 % (n=31) luonnonkumiallergisista terveydenhuollon työntekijöistä reagoivan kolmen eri serologisen *in vitro* -testin perusteella ei-ammoniidusta lateksista puhdistetulle Hevb2-proteiinille. Spina bifida -potilaista vastaavasti 38–54 %:lla (n=13) oli proteiinille spesifistä IgE-vasta-ainetta. Bernstein ym. (2003) osoittivat ei-ammoniidusta lateksista eristetyn Hevb2-proteiinin antavan *in vivo* -ihopistotestissä positiivisen vasteen 63 %:lle (n=62) terveydenhuollon työntekijöistä, joilla oli todettu luonnonkumiallergia. Kurup ym. (2005) osoittivat myös myöhemmin *in vitro* -kokeilla puhdistetun Hevb2-proteiinin sitoutuvan merkittävässä määrin lateksiallergisten terveydenhuollon työntekijöiden (n=26) seerumin IgE-vasta-aineisiin. Raulf-Heimsothin ym. (2007) laajemmat *in vitro* IgE-tutkimukset osoittivat, että noin 65–80 % saksalaisista, portugalilaisista ja amerikkalaisista luonnonkumiallergisista terveydenhuollon työntekijöistä (n=51+21+32=104) reagoi natiivi-Hevb2-proteiinille. Spina bifida -potilaiden tulokset osoittivat myös proteiinin merkittäväksi allergeeniksi, kun puhdistettu proteiini sitoutui 15/18 (83 %) luonnonkumille oireilevan potilaan seerumin IgE-vasta-aineisiin.

Suomessa tehty preliminääritutkimus sen sijaan osoitti, että Hevb2 ei ole merkittävä allergeeni, sillä vain 17 %:lla suomalaisista luonnonkumiallergisista potilaista

(n=100) oli perusteellisesti puhdistettua natiivia Hevb2-proteiinia vastaan IgE-vasta-ainetta (Palosuo ym. 2004). Lisäksi Palosuo ym. (2007a) suurella potilasjoukolla toteutettu tutkimus, jossa hyvin puhdistetun Hevb2-proteiinin allergeenista luonnetta tutkittiin serologisilla analyyseillä, vahvisti tämän aiemman tutkimuksen havainnon. Tässä koejärjestelyssä seerumit olivat peräisin 215 luonnonkumiallergiselta aikuispotilaalta, joista 79 oli Suomesta, 74 Espanjasta ja 62 Amerikasta. Lisäksi kontrollinäytteinä käytettiin 172 (n=73+50+49) atooppisen, mutta ei luonnonkumille herkistyneen henkilön seerumeja. Hevb2 puhdistettiin ei-ammonioidun lateksin B-seerumista ei-denaturoivilla kationin- ja geelisuodatuskromatografioilla. Hevb2-proteiinille spesifisten IgE-vasta-aineiden yleisyys eri maiden potilaiden seerumeissa vaihteli jonkin verran. Espanjalaisilla se oli harvinainen (5 %), ja suomalaisilla (15 %) ja amerikkalaisilla (11 %) potilaillakin havaittiin vain vähäisiä määriä IgE:tä. Tulosten perusteella proteiinin ei voitu katsoa olevan merkittävä lateksiallergeeni.

### 1.3.7 Ristiallergia ja lateksi-hedelmä-oireyhtymä

Eri kasvien sisältämät allergeenit reagoivat usein ristiin. Kun kasvien allergeeneilla on rakenteellisia yhtäläisyyksiä, ihmisen immunologisten muistisolujen aktivoituminen tapahtuu myös muiden kuin varsinaisen herkistymistä aiheuttavan allergeenin takia (Haahtela ym. 2007).

Luonnonkumin tiedetään muodostavan ristiallergiaa sekä kasvipenäisten ruoka-aineiden että siitepölyn kanssa (Blanco ym. 1994, Frankland 1995, Fuchs ym. 1997, Turjanmaa ja Mäkinen-Kiljunen 2000, Yagami ym. 2002). Luonnonkumin ja banaanin välinen yhteys havaittiin ensimmäisen kerran, kun M'Raihi ym. (1991) raportoivat banaanin aiheuttavan luonnonkumiallergisille potilaille koko elimistöön vaikuttavia allergisia reaktioita. Luonnonkumiallergisilla potilailla esiintyy usein lateksi-hedelmä-oireyhtymäksi kutsuttua ristiallergiaa, jossa erityisesti tuoreet hedelmät kuten avokado, banaani ja kiivi aiheuttavat heille välittömiä allergiaoireita (Ceuppens ym. 1992, Blanco ym. 1994, Mäkinen-Kiljunen

1994, Ahlroth ym. 1995, Wagner ja Breiteneder 2002). On raportoitu, että jopa yli puolet luonnonkumille allergisista ihmisistä ovat allergisia myös tietyille kasvipölyille ruoka-aineille (Wagner ja Breiteneder 2002). Muita ristireagoivia ruoka-aineita voivat olla mm. kastanja, viikuna, tomaatti, paprika ja peruna (Kurup ym. 1994, Lavaud ym. 1997, Blanco ym. 1999, Wagner ym. 2004, Asero ym. 2005).

Puolustukseen liittyvien proteiinien, joita muodostuu mikrobien ja muiden räsien vaikutuksesta, tiedetään muodostavan ristireagoivien kasviallergeenien perheen (Midoro-Horiuti ym. 2001, Yagami 2002a, b). Lateksin proteiineista ainakin Hevb2, 4, 6, 7, 11, ja 12 liittyvät jollakin tapaa kumipuun puolustusvasteeseen (Yagami ym. 2002). Vastaavasti useilla lateksi-hedelmä-oireyhtymään liittyvillä, ristiallergiaa aiheuttavilla kasvipölyillä ruoka-aineilla on samanlainen rooli puolustusvasteessa (Salcedo ym. 1999). Useimmissa tapauksissa lateksiallergeeni, joka liittyy ristiallergiaan, on heveini (Hevb6.02, proheveinin N-terminaalinen fragmentti), jolle homologisia proteiineja on tavattu avokadosta, banaanista, kiivistä, tomaatista, passionhedelmästä, papajasta ja mangosta (Chen ym. 1998, Salcedo ym. 2001). Toinen lateksiallergeeni, joka on yhdistetty lateksi-hedelmä-oireyhtymään, on Hevb2-proteiini, ja sille homologisia proteiineja on tavattu mm. avokadosta, kastanjasta, banaanista, kiivistä, viikunasta ja paprikasta (Breiteneder ja Ebner 2000, Wagner ym. 2004). Yagami ym. (1998) havaitsivat, että kasviallergisilla atooppisilla potilailla, kuten myös luonnonkumiallergisilläkin oli molemmilla spesifistä IgE-vasta-ainetta luonnonkumista eristettyä Hevb2-proteiinia vastaan. Luokan I kitinaaseja pidetään tärkeimpinä panallergeeneina (yleisallergeeni), jotka on yhdistetty ristireaktioihin, ja useissa tutkimuksissa ne onkin tunnistettu tärkeiksi IgE:hen sitoutuviksi komponenteiksi niin luonnonkumissa (Hevb11), avokadossa, banaanissa, kastanjassa, passionhedelmässä, kiivissä, papajassa, mangossa ja tomaatissa (Wagner ja Breiteneder 2002). Patatiinin kaltaisen Hevb7-proteiinin ja perunan patatiinin välistä ristireaktiivisuutta on myös tutkittu (Schmidt ym. 2002), mutta vaikuttaa siltä, että sen rooli lateksi-hedelmä-oireyhtymässä on yhä epäselvä (Seppälä ym.

2000). Kasvien profiiliinit ovat myös tärkeitä panallergeeneja, joita esiintyy ruokakasveissa, kaikissa siitepölyissä ja luonnonkumissa (Ganglberger ym. 2001). Kasvien profiiliineilla on keskenään noin 70 % aminohapposekvenssihomologia (Masilamani ym. 2012). Luonnonkumin profiiliinin (Hevb8), joka on potentiaalinen ristireagoiva allergeeni luonnonkumin, ruokakasvien ja siitepölyjen keskuudessa (Ganglberger ym. 2001), on havaittu ristireagoivan mm. banaanin ja paprikan profiiliinien kanssa (Reindl ym. 2002, Wagner ja Breiteneder 2002). Myös Hevb5 ja Hevb12 -proteiinien on tunnistettu osallistuvan lateksi-hedelmä-oireyhtymään (Vandenplas ja Raulf 2017).

Monet kasviperaiset proteiinit ovat glykosyloituneita ja jotkut niiden hiilihydraattirakenteista ovat vain kasveille ja selkärangattomille ominaisia. Pelkät glykaanit ovat usein heikosti immunogeenisiä, mutta kasviglykoproteiinit sen sijaan saavat nisäkäsglykoproteiineista poiketen aikaan voimakkaan immuunivasteen. Kasviglykaaneille spesifiset vasta-aineet ovat usein ristireaktiivisia eli ne eivät tunnista eri kasviglykaaneja, vaan reagoivat erisukuisista kasveista peräisin olevien glykoproteiinien kanssa. Tätä kasvien glykaaniepitooppia kutsutaan ristireagoivaksi hiilihydraattideterminantiksi (engl. cross-reactive carbohydrate determinant, CCD) (Aalberse 1997, Aalberse ja van Ree 1997).



## 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tarkoituksena oli puhdistaa ja tunnistaa Hevb2-proteiini ( $\beta$ -1,3-glukanaasi) *Hevea brasiliensis* -kumipuun maitiaisnesteestä eli lateksista ultrasentrifugoimalla erotellun pohjafraktion lutoidien sisältämästä B-seerumista sekä karakterisoida tätä puhdistettua proteiinia. Tutkimuksessa käytettiin erilaisia nestekromatografisia, massaspektrometrisiä sekä proteiinikemiallisia menetelmiä. Lisäksi tarkoituksena oli löytää immunologisiin analyyseihin sopiva puhdistusmenetelmä, ja käyttää puhdistettua proteiinia alustavissa analyyseissä osoittamaan, onko suomalaisten potilaiden seerumeissa Hevb2-proteiinille spesifistä IgE-vasta-ainetta.

Työ tehtiin 11.6.2001 – 31.3.2002 välisenä aikana Helsingin yliopiston Biotekniikan Instituutin proteiinikemian laboratoriossa ja työn ohjaajina toimivat laboratorionjohtaja FT Nisse Kalkkinen sekä vanhempi tutkija FT Leena Valmu. Immunologiset tutkimukset toteutettiin yhteistyössä Kansanterveyslaitoksen (KTL) immunobiologian laboratorion kanssa professori Timo Palosuon johdolla.

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 3.1 Lähtömateriaali

Hevb2-proteiinin puhdistuksen lähtömateriaalina käytettiin KTL:n immunobiologian laboratoriosta saatua B-seerumia, joka oli peräisin Malesian kumintutkimusinstituutista (engl. Rubber Research Institute of Malaysia) Kuala Lumpurista. B-seerumi oli saatu kumipuun, *Hevea brasiliensis*, tuoreesta lateksista, joka oli kerätty Malesiassa ja ultrasentrifugoinnilla eroteltu päälli-, keski- ja pohjafraktioon. Pohjafraktiota oli sulatettu ja jäädytetty useita kertoja, jotta membraaniin sitoutuneet organellit, lutoidit saatiin rikottua ja niiden sisältämä B-seerumi vapautettua. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti otettiin talteen ja säilytettiin -70 °C:een lämpötilassa (Alenius ym. 1995a).

#### 3.2 Potilasseerumit

IgE-ELISA -kokeessa käytetyt seerumit olivat peräisin 73 suomalaiselta potilaalta, joiden ikäjakauma oli 7,5 kuukaudesta 68 vuoteen ja keskiarvo noin 33 vuotta (immunobiologian laboratorio, KTL, Helsinki). Yksi seerumeista toimi kokeessa negatiivisena ja toinen positiivisena kontrollina. Seerumien joukkoon oli valittu kuuden sellaisen potilaan seerumit, joiden luovuttajilla tiedettiin olevan luonnonkumiallergiaa (liite 1). Potilaista 78 % oli naisia ja 22 % miehiä. IgE-ELISA-kokeessa käytettiin lisäksi neljää erilaista seerumipoolia, joista yksi oli positiivinen ja toinen negatiivinen aikuispooli. Kaksi muuta poolia olivat Spina bifida -pooli ja toinen positiivinen pooli.

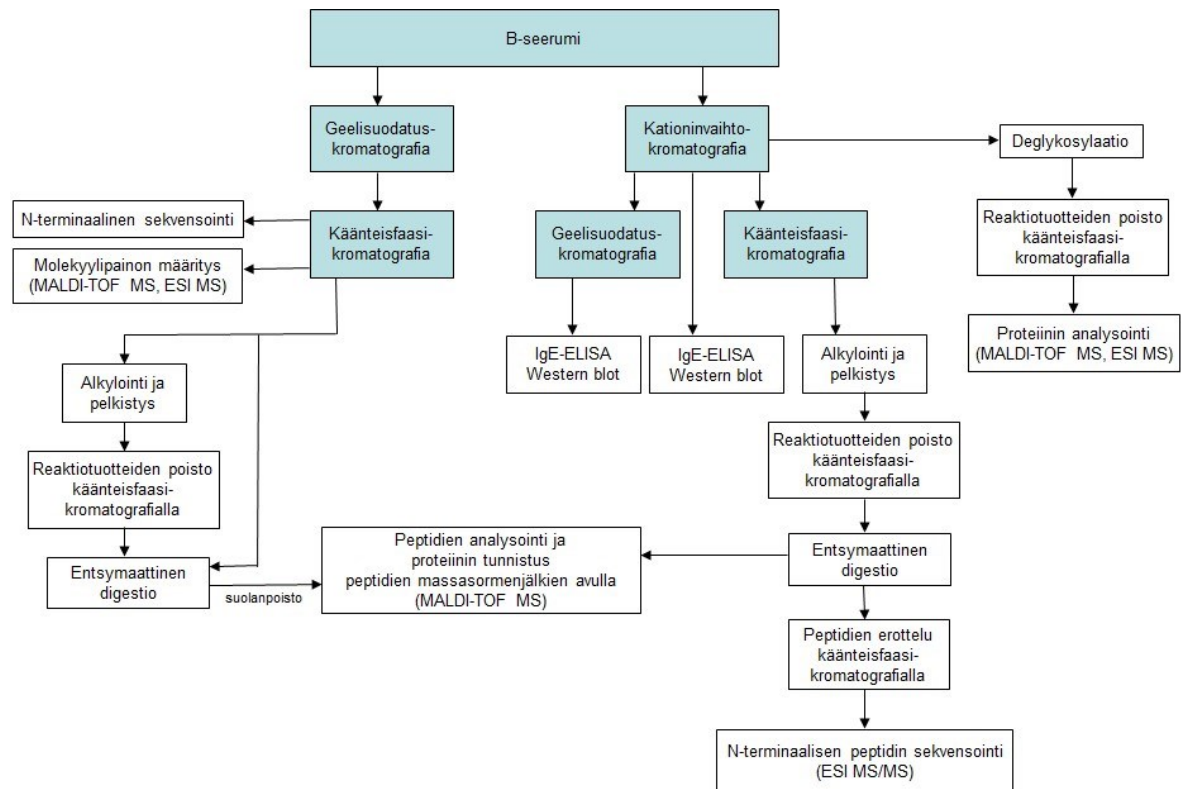
Western blot -analyysiin valittiin neljän luonnonkumiallergisen potilaan seerumit (ikäjakauma 2 vuodesta 51 vuoteen ja keskiarvo 22 vuotta, 50 % naisia ja 50 % miehiä). Aiemmissa IgE-ELISA-kokeissa (immunobiologian laboratorio, KTL) näiden potilaiden seerumeissa oli osoitettu olevan IgE-vasta-aineita vähintään yhtä

kumipuun viittä luonnonkumiallergeenia (Hevb1, 3, 5, 6 ja 7) vastaan (liite 1). Lisäksi analyysissä käytettiin yhtä negatiivista kontrolliseerumia.

Tutkimuksessa käytetyille potilasseerumeille oli saatu myönteinen lausunto Tampereen yliopistollisen sairaalan eettiseltä toimikunnalta.

### 3.3 Hevb2-proteiinin puhdistus nestekromatografisilla menetelmillä

Hevb2-proteiinin puhdistamiseen B-seerumista käytettiin kolmea erilaista nestekromatografista menetelmää: geelisuodatus-, käänteisfaasi- ja kationinvaihtokromatografiaa. Käytetyt menetelmät erosivat sen mukaan mihin tarkoitukseen proteiinia puhdistettiin (kuva 1).



Kuva 1. Hevb2-proteiinin puhdistus B-seerumista ja puhdistetun proteiinin tunnistus ja rakenteellinen karakterisointi erilaisilla massaspektrometrillä ja proteiinkemiallisilla menetelmillä sekä käyttö immunologisissa analyysissä.

### 3.3.1 Geelisuodatuskromatografia

Aiempien kokemusten perusteella Hevb2-proteiinin puhdistus B-seerumista aloitettiin geelisuodatuskromatografialla (Alenius ym. 1995a). Ennen geelisuodatusta B-seerumia suodatettiin 0,45 µm:n Millex-HV-kalvon (Millipore, Bedford, MA, USA) läpi liuoksen kirkastamiseksi. Noin 50–100 µl suodatettua B-seerumia ajettiin Superdex 75 HR 10/30 -pylväällä (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Ruotsi) korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) -laitteessa (malli 5000, Varian, Palo Alto, CA, USA) virtausnopeudella 0,5 ml/min. Ajopuskurina käytettiin fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS) ja ajoa seurattiin aallonpituudella 280 nm.

Toisen Hevb2-proteiinin kationinvaihtokromatografiafraktio puhdistettiin ja puskuri vaihdettiin ennen immunologisia analyysejä PBS:ksi Superdex 75 HR 10/30 -pylväällä ajamalla proteiinifraktio kahdessa erässä (yhteensä noin 1,5 ml) geelisuodatusmateriaalin läpi edellä kuvatulla tavalla. Ajoa seurattiin aallonpituudella 214 nm.

### 3.3.2 Kationinvaihtokromatografia

Hevb2-proteiini puhdistettiin B-seerumista kationinvaihtokromatografialla Mono S HR 5/5 -pylväällä (Amersham Pharmacia Biotech) HPLC-laitteessa (malli 5000, Varian) virtausnopeudella 1 ml/min. 400 µl B-seerumia laimennettiin 2 ml:ksi ajopuskuriin 50 mM Na-fosfaatti, pH 7,5 ennen näytteen imeyttämistä pylvääseen. Näyte eluoiitiin pylväästä lineaarisella NaCl-gradientilla 0–0,5 M 30 minuutissa ajopuskurissa. Ajoa seurattiin aallonpituudella 280 nm.

### 3.3.3 Käänteisfaasikromatografia

Geelisuodatuskromatografian proteiinifraktio (400–1000 µl) puhdistettiin käänteisfaasi (engl. reversed-phase, RP) -kromatografialla. RP-kromatografia suoritettiin 0,21 x 10 cm TSK TMS-250 -pylväällä (C1, TosoHaas Corporation, Tokio, Japani) HPLC-laitteessa (malli 140B, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

virtausnopeudella 0,2 ml/min. Eluutio suoritettiin asetonitriili (ACN) / 0,075 % trifluoroetikkahappo (TFA) -gradientilla (20–60 % 100 minuutissa) 0,1 % TFA:ssa. Ajoa seurattiin aallonpituudella 214 nm.

Noin 500 pmol:a (20 µg) kationinvaihtokromatografialla puhdistettua Hevb2-proteiinia ajettiin ennen alkylointia ja entsyymaattista digestiota 0,21 x 10 cm TSK TMS-250 RP-pylväällä kuten edellä, mutta eluutio suoritettiin ACN/0,075 % TFA -gradientilla (3–100 % 60 minuutissa) 0,1 % TFA:ssa. Lisäksi kationinvaihtokromatografialla puhdistetun Hevb2-proteiinin konsentraatio arvioitiin karkeasti ajamalla osa Mono S -fraktiosta (50–250 µl) 0,21 x 10 cm TSK TMS-250 RP-pylväällä vastaavalla tavalla, jossa eluutio suoritettiin ACN/0,075 % TFA -gradientilla (3–100 % 60 minuutissa) 0,1 % TFA:ssa.

RP-kromatografiaa käytettiin myös erilaisten reaktiotuotteiden poistoon Hevb2-proteiinin joukosta. Reaktiotuotteiden poistossa käytettiin alkyloinnin jälkeen 0,2 x 2 cm ja deglykosylaation jälkeen 0,21 x 10 cm TSK TMS-250 -pylvästä (C1, TosoHaas). Ajot suoritettiin kuten edellä ACN/0,075 % TFA -gradientilla (3–100 % 60 minuutissa) 0,1 % TFA:ssa virtausnopeudella 0,2 ml/min ja aallonpituudella 214 nm.

Ennen N-terminaalisen peptidin sekvensointia entsyymaattisesti digestoidut peptidit eroteltiin RP-kromatografialla 1 x 150 mm Vydac C8 -pylväällä (300 Å, 5 µm, MIC-15-05-C8, LC-Packings, Amsterdam, Alankomaat) virtausnopeudella 50 µl/min SMART System -laitteessa (Amersham Pharmacia Biotech). Eluutio suoritettiin ACN/0,075 % TFA -gradientilla (0–40 % 120 minuutissa) 0,1 % TFA:ssa ja ajoa seurattiin aallonpituuksilla 214, 254 ja 280 nm.

### 3.4 Puhdistetun Hevb2-proteiinin tunnistus ja karakterisointi

#### 3.4.1 Geelielektroforeesi

Eri nestekromatografisilla puhdistusmenetelmillä kerätyt proteiinifraktiot analysoitiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Analyyseissä käytettiin 12 % geelejä. Osa fraktiosta tai koko fraktionäyte kuivattiin vakuumisentrifuugilla ja liuotettiin 10–15 µl:aan 1-kertaista Laemmli-näytepuskuria. Molekyylipainostandardina käytettiin LMW-standardia (engl. low molecular weight, Amersham Pharmacia Biotech). Standardi ja näytteet kuumennettiin ennen geelille pipetoimista 5 min/100 °C. Ajo suoritettiin Mini Protean II -laitteella (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 1-kertaisessa Laemmli-ajopuskurissa vakiovirralla 25 mA/geeli. Proteiinivyöhykkeet värjättiin Coomassie Brilliant Blue (PhastGel Blue R, Amersham Pharmacia Biotech) -värillä (0,1 % CBB 10 % etikkahappo/30 % metanoli -liuoksessa) ja värin poisto suoritettiin 10 % etikkahappo/40 % metanoli -liuoksella.

#### 3.4.2 Alkylointi ja entsymaattinen digestio

Noin 500 pmol:a (20 µg) geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografiolla sekä kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografiolla puhdistettua proteiininäytettä kuivattiin vakuumisentrifuugilla ja lisättiin joukkoon 50–80 µl alkylaatiopuskuria (6 M guanidiinihydrokloridi, 2 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappo EDTA, 0,5 M Tris pH 7,5). Proteiininäytteet pelkistettiin ensin lisäämällä niihin 5 µl 0,6 M ditiotreitolia (DTT) ja pitämällä noin 30 min huoneenlämmössä (RT). Proteiinien alkylointi tapahtui lisäämällä joukkoon 1 µl 4-vinyylipyridiiniä (4-VP) ja pitämällä 20 min RT (pimeässä). Reaktio pysäytettiin lisäämällä 5 µl 0,6 M DTT:tä. Reaktiotuotteet poistettiin käänteisfaasikromatografiolla. Talteen kerätyt proteiininäytteet kuivattiin vakuumisentrifuugilla ennen entsymaattista digestiota modifioidulla trypsiinillä (V5111, Promega, Madison, WI, USA). Digestio tehtiin myös geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografiolla puhdistetulle, mutta alkyloimattomalle Hevb2-proteiinille (noin 40 pmol, 1,5 µg). Kuivattuihin Hevb2-

proteiininäytteisiin lisättiin 0,2–0,6 µg trypsiiniliuosta sekä 50 µl 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (ammoniumbikarbonaatti, Ambic), ja reaktion annettiin tapahtua yön yli +37 °C:ssa.

### 3.4.3 Peptidien analysointi ja proteiinin tunnistus (MALDI-TOF MS)

Trypsiini-digestoidun Hevb2-proteiinin peptidinäytteet analysoitiin MALDI-TOF MS:lla (matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria) käyttämällä Biflex-massaspektrometriä (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Saksa), joka oli varustettu 337 nm tyypilaserilla ja jossa peptidit analysoitiin positiivisella kiihdytysjännitteellä reflektorimoodissa. Matriisina käytettiin α-syano-4-hydroksikanelihappoa (kylläinen 30 % ACN/0,1 % TFA -liuos) ja sisäisenä standardina angiotensiini II (m/z = 1046,52, A9525, Sigma, St. Louis, MO, USA) ja ACTH-fragmentti 18–39 (m/z = 2466,20, A0673, Sigma) -seosta (3 pmol/µl angiotensiini II ja 5 pmol/µl ACTH).

Ennen peptidimassojen määrittystä MALDI-TOF MS:lla digestionäytteistä (5–10 µl) poistettiin suolat ZipTipC<sub>18</sub>-menetelmällä (Millipore), jossa käytetty ZipTip-pipetinkärki sisälsi peptidinäytteiden suolanpoistoon ja konsentrointiin sopivaa C<sub>18</sub>-käänteisfaasimateriaalia. Kärki kostutettiin 50 % ACN:llä ja tasapainotettiin viisi kertaa 0,1 % TFA:lla. Peptidinäyte imeytettiin materiaaliin ja pestiin tämän jälkeen kaksi kertaa 0,1 % TFA:lla. Näyte eluoitiin 3–5 µl:aan 60 % ACN/0,1 % TFA -liuosta ja analysoitiin välittömästi Biflex-massaspektrometrillä.

Peptidinäytteiden analysoimiseksi näytelevylle pipetoitiin 1 µl peptidinäytettä ja 1 µl matriisi-standardi-seosta (15 µl kylläistä matriisiliuosta ja 1 µl standardiseosta) Näytteet kuivattiin levylle lämpimällä ilmavirralla ja analysoitiin MALDI-TOF MS:lla.

SMART HPLC -kromatografialaitteistossa C8-käänteisfaasipylväällä erotellut peptidifraktiot analysoitiin vastaavasti MALDI-TOF MS:lla. RP-fraktioista otettiin joko suoraan 1 µl:n näyte näytelevylle tai noin puolet ZipTipC<sub>18</sub>-suolanpoistoon,

josta peptidinäyte eluoiitiin suoraan näytelevylle 1,5 µl:ssa 60 % ACN/0,1 % TFA -liuosta.

Proteiinin tunnistamiseksi saatuja peptidimassoja verrattiin ProFound-tietokantahakuohjelmalla NCBI:n tietokannan sisältävien proteiinien teoreettisiin peptidimassasormenjälkiin (engl. peptide mass fingerprinting, PMF).

#### 3.4.4 Proteiinin molekyylipainon määrittäminen (MALDI-TOF MS, ESI MS)

Hevb2-proteiinin molekyylipaino määritettiin Biflex MALDI-TOF-massaspektrometrillä (Bruker-Franzen Analytik) positiivisella kiihdytysjännitteellä lineaarimoodissa sekä sähkösumutus-ionisaatio (ESI) MS:lla käyttäen kuadrupoli-lentoaika (Q-TOF) -massaspektrometriä (Micromass, Manchester, UK).

Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetun Hevb2-proteiinin RP-piikin huippufraktiosta otettiin 1 µl näyte Biflex-massaspektrometriin. Matriisina käytettiin kylläistä sinapiinihappoliuosta, jossa sinapiinihapon (Fluka Chemie AG, Buchs, Sveitsi) joukkoon oli lisätty 0,1 % TFA ja ACN (1:1). Ulkoinen kalibraatio suoritettiin 10 pmol:lla naudan seerumin albumiinia (BSA, Sigma). Näytelevylle pipetoitiin 1 µl proteiininäytettä ja 1 µl matriisia ja seos kuivattiin lämpimällä ilmavirralla ennen analysointia MALDI-TOF MS:lla.

Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetun Hevb2-proteiinin RP-piikin huippufraktion proteiinikonsentraatio arvioitiin karkeasti ja siitä otettiin noin 30–60 pmol:a ESI Q-TOF -massaspektrometriin. Näyte kuivattiin tarvittaessa noin 2 µl:n tilavuuteen vakuumisentrifuugilla ja laimennettiin noin 20 µl:ksi 0,1 % muurahaishappo/50 % ACN -liuoksella ennen sen injektointia Q-TOF-laitteistoon. Kalibrointi toteutettiin 20 pmol:lla myoglobiinia, joka laimennettiin 100 µl:ksi kuten edellä. Myös kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetun Hevb2-proteiinin molekyylipaino määritettiin vastaavasti Q-TOF-laitteistolla.



### 3.4.5 N-terminaalinen sekvensointi

Edman degradaatioon (Edman 1950) perustuva Hevb2-proteiinin N-terminaalinen sekvensointi suoritettiin Procise 494A -sekvensointilaitteella (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Noin 40–100 pmol (1,5–3,5 µg) geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistettua proteiinifraktiota imeytettiin alle 60 µl:ssa (useassa erässä) lasikuitufilterille (Whatman GF, Englanti), johon oli ensin imeytetty 1,5 mg Biobrene Plus -kantajaa (Applied Biosystems). Sekvensointi suoritettiin 13 syklin sarjassa, joista 10 viimeisimmässä proteiinin N-terminaalista päästä poistui peräkkäin yksi aminohappo. Irronneiden PTH-aminohappojohdannaisien analyysi suoritettiin käänteisfaasikromatografialla.

### 3.4.6 N-terminaalisen peptidin sekvensointi (ESI MS/MS)

Peptidimassa-analyysin perusteella valitun, sekvensointiin menevän N-terminaalisen peptidin loput RP-fraktiosta (noin 7 pmol, 0,25 µg) laitettiin ESI MS/MS (tandemmassaspektrometria) -analyysiin. Analyysissä käytettiin Micromassin Q-TOF-laitteistoa, joka sisälsi kolme eri massa-analysointia yhdessä (kaksi kuadrupoli-massa-analysointia ja viimeisenä TOF-analysointia). Näyte kuivattiin noin 3 µl:ksi vakuumisentrifuugilla ja sen joukkoon lisättiin 7 µl 0,1 % muurahaishappo/50 % ACN -liuosta. Laitteiston kalibrointi suoritettiin vihreä fluoresoiva proteiinilla (engl. green fluorescent protein, GFP, 5 pmol/µl). Sekvenssi (y-ionit) luettiin Biolynx-ohjelmalla.

### 3.4.7 Deglykosylaatioanalyysi

Apotransferriini-proteiininäyte (80 µg) kuumennettiin 3 min/+100 °C 20 mM Na-fosfaatti, pH 7,2/1 % SDS -liuoksessa (10 µl), jäähdytettiin ja lisättiin joukkoon 10 µl 10 % n-oktyyli-β-D-glukosidia (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) ja 80 µl Na-fosfaattia, pH 7,2, että reaktiutilavuudeksi saatiin 100 µl. Näiden joukkoon lisättiin vielä 2U (2 µl) N-glykosidaasi F -entsyymiä (Roche Diagnostics, Mannheim, Saksa). Deglykosylaatioanalyysi toteutettiin myös ilman detergentejä lisäämällä

apotransferriinin (1 µl, 80 µg) joukkoon 9 µl Na-fosfaattia, pH 7,2 ja 2 U entsyymiä. Deglykosylaatioreaktion annettiin tapahtua yön yli +37 °C:ssa. Näytteet puhdistettiin käänteisfaasikromatografialla ja RP-piikin huippufraktiosta otettiin suoraan 1 µl:n näyte Biflex MALDI-TOF -massaspektrometriin ja analysoitiin kuten edellä (3.4.4).

Hevb2-proteiinin (10–20 µg) kationinvaihtokromatografiafraktion puskuri vaihdettiin 20 mM Na-fosfaattiin, pH 7,2 Microcon-sentrifuugifiltterillä (Millipore). Proteiininäytteen (noin 30 µl) joukkoon lisättiin 2U (2 µl) N-glykosidaasi F -entsyymiä ja näytettä pidettiin yön yli +37 °C:ssa. Näytteiden RP-puhdistuksen jälkeen ne analysoitiin ESI Q-TOF -massaspektrometrillä kuten edellä (3.4.4).

### **3.5 Hevb2-proteiinille spesifisen IgE-vasta-aineen osoitus suomalaisten potilaiden seerumeista immunologisilla analyyseillä**

#### **3.5.1 IgE-ELISA**

IgE-ELISA-analyysejä varten Hevb2-proteiinin konsentraatio määritettiin karkeasti ja geelisuodatus- tai kationinvaihtofraktiosta tehtiin 2 µg/ml laimennos 50 mM Na-karbonaattipuskuriin, pH 9,6. Proteiinilaimennosta pipetoitiin 96-kuoppaiselle polystyreenimikrotiitterilevyille (Nunc, Roskilde, Tanska) 100 µl/kuoppa ja näytteiden annettiin sitoutua levyille ensin 3 h RT ja sen jälkeen yön yli +4 °C:ssa. Näytteet poistettiin levyiltä, kuoppiin lisättiin 100 µl 1 % ihmisen seerumin albumiinia (HSA, 20 %, SPR, Veripalvelu) 50 mM Na-karbonaattipuskurissa, pH 9,6 ja sen annettiin vaikuttaa 1 h RT. Kuopat tyhjennettiin ja ne pestiin kolme kertaa PBS-pesupuskurilla, joka sisälsi 0,05 % Tween 20 (PBS-T). Potilas- ja kontrolliseerumit laimennettiin 1:10 PBS-T:llä, johon oli lisätty 0,2 % HSA:ta (PBS-T-HSA) ja seerumien pipetoimisen jälkeen (100 µl/kuoppa, 2 rinnakkaista) levyä pidettiin 2 h RT. Kuoppien pesu suoritettiin kuten edellä. Kuoppiin lisättiin 100 µl 1:1000 PBS-T-HSA:han laimennettua biotinyloitua vuohen ihmistä vastaan tuotettua (anti-human) IgE-vasta-ainetta (Vector Laboratories, Burlingame, CA,

USA) ja levyä pidettiin 1 h RT. Kuopat pestiin jälleen kolmesti PBS-T:llä ja pesun jälkeen niihin lisättiin 100 µl streptavidiinilla konjugoitua alkaalinen fosfataasi -entsyymiä (Bio-Rad Laboratories), joka oli laimennettu 1:3000 PBS-T-HSA:lla. Entsyymikonjugaatin annettiin vaikuttaa 1 h RT. Levyn pesun jälkeen kuoppiin lisättiin 100 µl substraattilaimennosta (104, Sigma) 1 mg/ml karbonaattipuskurissa, pH 9,8. Muodostunut värireaktio luettiin noin 40 min kuluttua kehityksen aloittamisesta ELISA-lukijalla (Multiskan plus, Labsystems, Helsinki, Suomi) aallonpituudella 405 nm.

Mittaustulokset normalisoitiin ( $\bar{x}$ ) yhtälöllä, jossa positiivisen kontrollin rinnakkaisten tulosten normalisoiduksi keskiarvoksi asetettiin 1:

$$\bar{x} = (x_i / y_{ka}) * 1, \quad (1)$$

jossa  $x_i$  on mittaustulos ja  $y_{ka}$  on positiivisen kontrollin rinnakkaisten tulosten keskiarvo.

### 3.5.2 Western blot

Kationinvaihtokromatografialla puhdistettu tai kationinvaihto- ja geelisuodatuskromatografialla puhdistettu Hevb2-proteiini eroteltiin 13 % SDS-PAGE-geelillä. Ajoon laitettiin 2 µg proteiinia/kuoppa ja standardina käytettiin Rainbow™ värjättyä molekyylipainomarkkeria (RPN 756, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Englanti). Tarvittava määrä Hevb2-proteiinia kuivattiin pienempään tilavuuteen vakuumisentrifuugilla ja siitä tehtiin 1:3 laimennos Laemmli-näytepuskuriin.

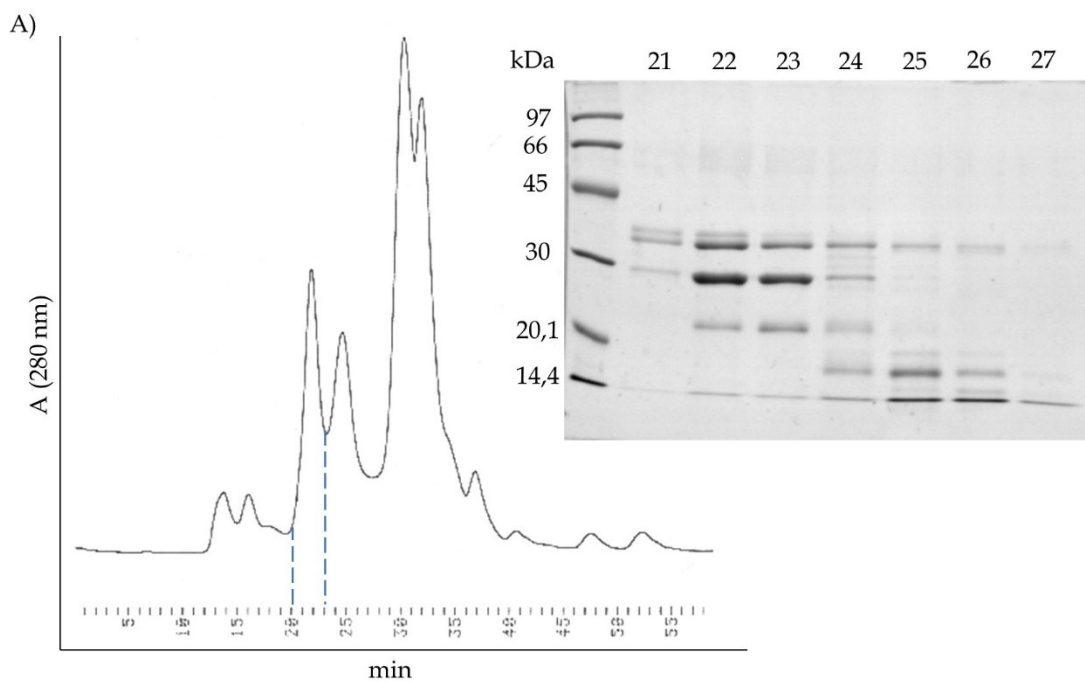
Näytteet ja standardi kuumennettiin 3 min/+100 °C ja sentrifugoitiin 3 min/12500 rpm (EBA 12, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Saksa). Ajo suoritettiin Mini Protean II -laitteella (Bio-Rad Laboratories) 1-kertaisessa Laemmli-ajopuskurissa jännitteellä 100 V/geeli.

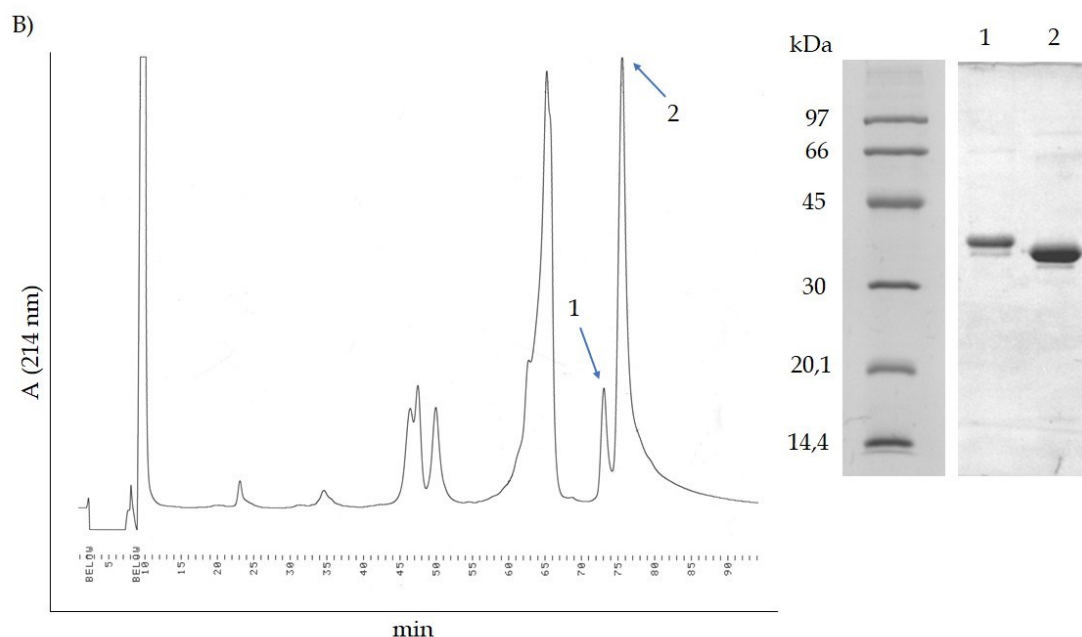
SDS-PAGE:lla erotellut proteiiniyöhykkeet siirrettiin polyvinyyliidifluoridi (PVDF) -kalvolle (Immobilon-P, Millipore) Mini-Trans-Blot-laitteella (Bio-Rad Laboratories). Immunoblottauksessa käytettiin 25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % metanoli, pH 8,3 -puskuria ja ajo suoritettiin 100 V jännitteellä yhden tunnin ajan. Kalvon proteiiniyöhykkeet värjättiin Ponceau S -värillä (0,2 % Ponceaus S red, 3 % trikloorietikkahappo). Väripoiston jälkeen PVDF-kalvoa pidettiin tunnin verran kyllästyspuskurissa, joka sisälsi 5 % rasvatonta maitojauhetta Tris-puskuroidussa suolaliuoksessa (10 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 7,5) (TBS). Kalvo siirrettiin Miniblotteriin (Biometra, Göttingen, Saksa) ja potilasseerumeja, jotka oli laimennettu 1:5 kyllästyspuskuriin, lisättiin 130 µl/kanava. Miniblotteri siirrettiin edelleen tasoravistelijaan ja pidettiin yön yli +4 °C:ssa. Kalvoa pestiin 4 x 5 min 0,1 % Tween 20/TBS -liuoksella ja sen jälkeen käsiteltiin 30 min RT kyllästyspuskuriin 1:1000 laimennetun biotinyloidun vuohen ihmistä vastaan tuotetun IgE-vasta-aineen (Vector Laboratories) kanssa. PVDF-kalvo irrotettiin Miniblotterista ja sitä pestiin pesupuskurilla kuten edellä. Kalvolle tehtiin ylimääräinen kyllästys ja 5 min käsittelyn jälkeen kyllästyspuskuri poistettiin ja kalvoa pestiin 0,1 % Tween 20/TBS -liuoksella. Kalvolle lisättiin streptavidiinilla konjugoitua alkaalinen fosfataasi -entsyymiä (Zymed, Camarillo, CA, USA), joka oli laimennettu 1:24000 TBS-puskuriin. 30 min vaikutusajan ja pesujen jälkeen (3 x 5 min 0,1 % Tween 20/TBS ja 1 x 5 min TBS) kalvo asetettiin värinkehitysliuokseen (Bio-Rad Laboratories) ja reaktio pysäytettiin 10 min kuluttua huuhtelemalla kalvoa tislattulla vedellä.

## 4 TULOKSET

### 4.1 Hevb2-proteiinin puhdistus B-seerumista

Proteiinin puhdistus B-seerumista aloitettiin geelisuodatuskromatografialla. Geelisuodatuksella B-seerumista saatiin eroteltua useita fraktioita, jotka kerättiin ja analysoitiin SDS-PAGE:lla (kuva 1A). Koska proteiinin molekyylipainon tiedettiin olevan noin 36 kDa (Alenius ym. 1995a), valittiin sellaiset fraktiot, jotka geelielektroforeesin perusteella sisälsivät tämän kokoluokan proteiinin, edelleen puhdistettavaksi käänteisfaasikromatografialla. Käänteisfaasikromatografialla proteiini saatiin eroteltua B-seerumin muista lateksiproteiineista ja SDS-PAGE osoitti kahden suunnilleen samankokoisen proteiinin eluoituvan RP-pylvästä kahdessa hydrofobisimmassa fraktiossa (kuva 1B).



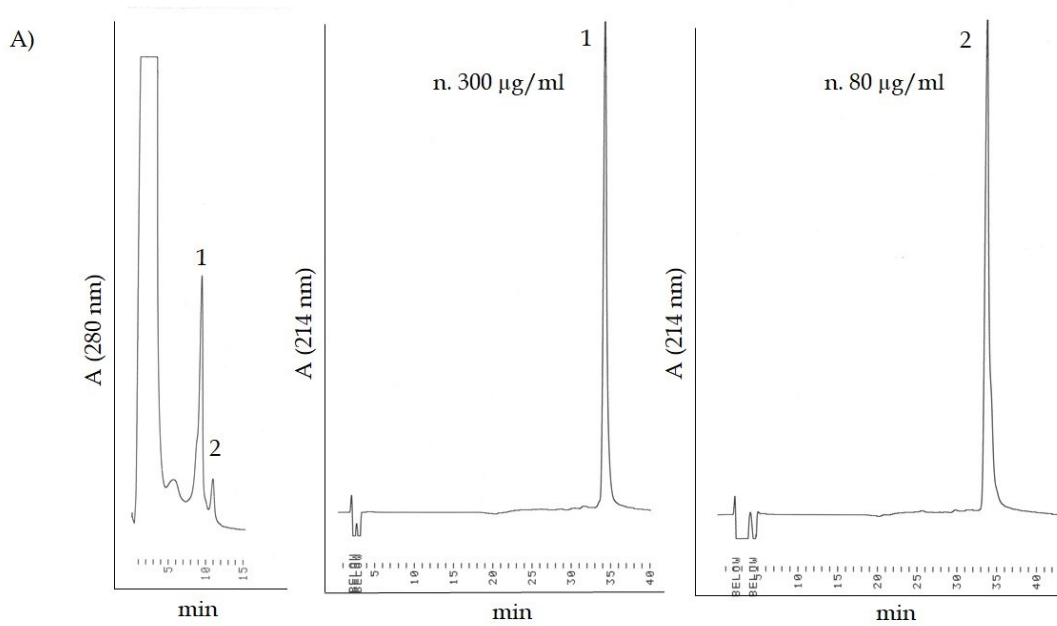


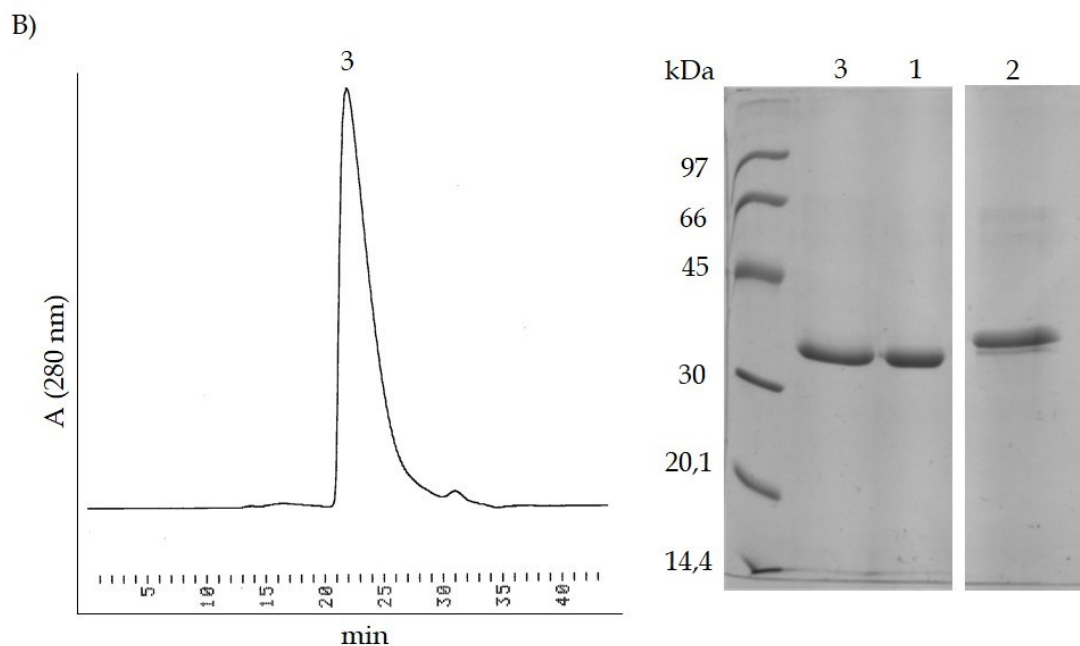
Kuva 1. A) Proteiinin puhdistus B-seerumista Superdex 75 -geelisuodatuspylväällä PBS:ssä ja fraktioiden geielektroforeesi. Fraktiot 21–23 yhdistettiin ja puhdistettiin edelleen käänteisfaasikromatografialla. B) Käänteisfaasikromatografia suoritettiin C1-pylväällä lineaarisella ACN-gradientilla (20–60 % 100 min) 0,1 % TFA:ssa virtausnopeudella 0,2 ml/min. Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografian fraktiot analysoitiin 12 % SDS-PAGE-geelillä.

#### 4.2 Hevb2-proteiinin puhdistus vasta-ainemäärityksiä varten

Käänteisfaasikromatografian denaturoivan luonteen takia puhdistettuja proteiineja ei voitu käyttää sellaisenaan IgE-ELISA-analyysissä. RP-puhdistetun proteiinin puskurinvaihtoa testattiin useammalla menetelmällä kuten myös muita B-seerumin geelisuodatuskromatografiamenetelmiä. Proteiinia saatiin puhdistettua lopulta immunologisia analyysejä varten riittävä määrä ja oikeanlaisessa puskurissa B-seerumista kationinvaihtokromatografialla (kuva 2A). Puhdistettujen proteiinien konsentraatit määritettiin karkeasti RP-pylväällä piikkien pinta-alojen avulla (kuva 2A). Molekyylipainoltaan pienempää proteiinia puhdistettiin edelleen geelisuodatuskromatografialla ja sen puskuri vaihdettiin geelisuodatuksella

PBS:ksi (kuva 2B). Talteen kerätyt fraktiot niin kationinvaihto- kuin geelisuodatuskromatografiasta analysoitiin 12 % SDS-PAGE-geelillä (kuva 2B). Suuremman proteiinin kationinvaihtofraktiota käytettiin IgE-ELISA ja Western blot -analyysissä sellaisenaan. Saatujen tulosten perusteella proteiini näytti puhdistuvan hyvin muista B-seerumin proteiineista. Molekyylipainoltaan suurempi proteiini eluoi Mono S -pylvästä kationisempänä eli emäksisempänä piikissä 2.





Kuva 2. A) Proteiinin puhdistus B-seerumista Mono S -kationinvaihtopylväällä (pH 7,5) lineaarisella NaCl-gradientilla (0-0,5 M 30 min) 50 mM Na-fosfaatti, pH 7,5 -puskurissa virtausnopeudella 1 ml/min. Numeroidut fr. 1 ja 2 kerättiin talteen ja proteiinkonsentraatiot määritettiin karkeasti C1-käänteisfaasipylväällä lineaarisella ACN-gradientilla (3-100 % 60 min) 0,1 % TFA:ssa virtausnopeudella 0,2 ml/min. B) Mono S -ajon fr. 1 puhdistus Superdex 75 -geelisuodatuksella PBS:ssä. Mono S ja Superdex 75 -ajojen fr. 1, 2 ja 3 analysoitiin 12 % SDS-PAGE-geelillä.

#### 4.3 Hevb2-proteiinin tunnistus peptidien massasormenjälkien avulla (MALDI-TOF MS)

Puhdistettujen proteiinien entsymaattinen digestio sekä syntyneiden peptidien massasormenjälkien määrittäminen Biflex MALDI-TOF-massaspektrometrillä (liite 2) ja saatujen peptidimassojen vertailu ProFound-tietokantahakuohjelmalla NCBI:n tietokannan sisältämien proteiinien teoreettisiin peptidimassasormenjälkiin osoitti molempien proteiinien olevan kumipuun *Hevea brasiliensis*  $\beta$ -1,3-glukanaaseja (liite 3). Tietokantahaku antoi hyvän osuman useammalle *Hevea*



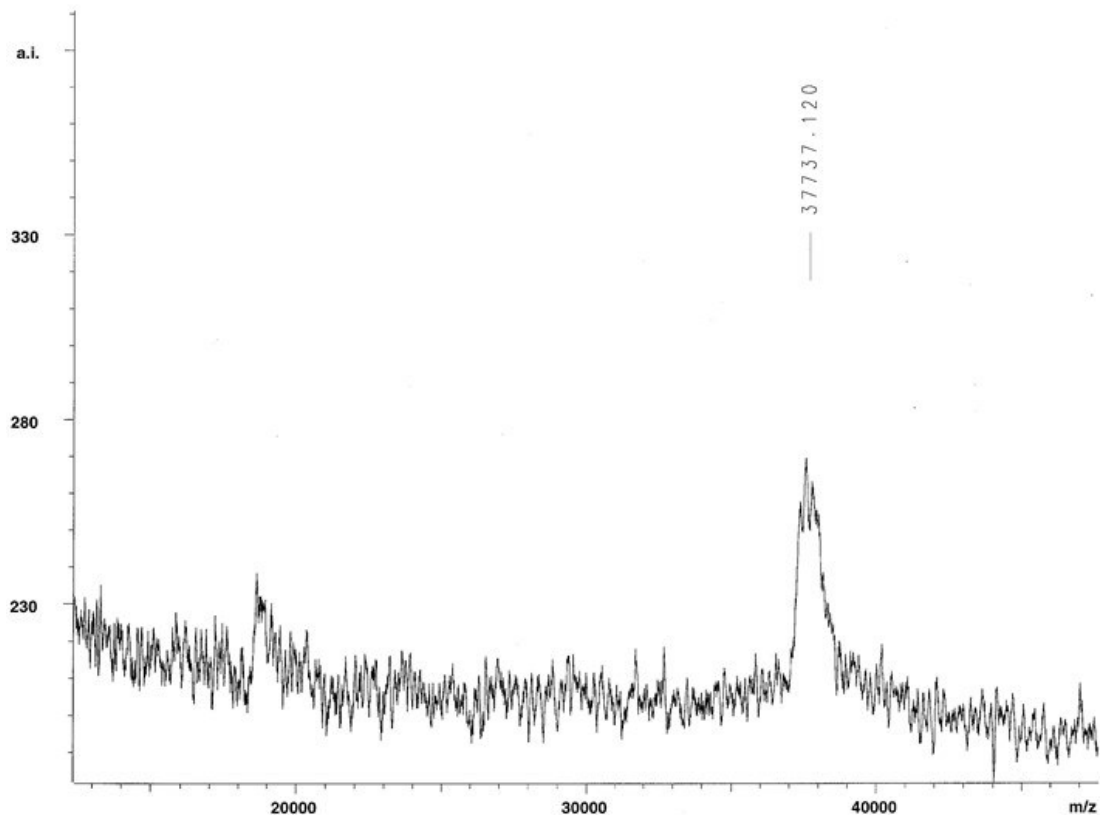
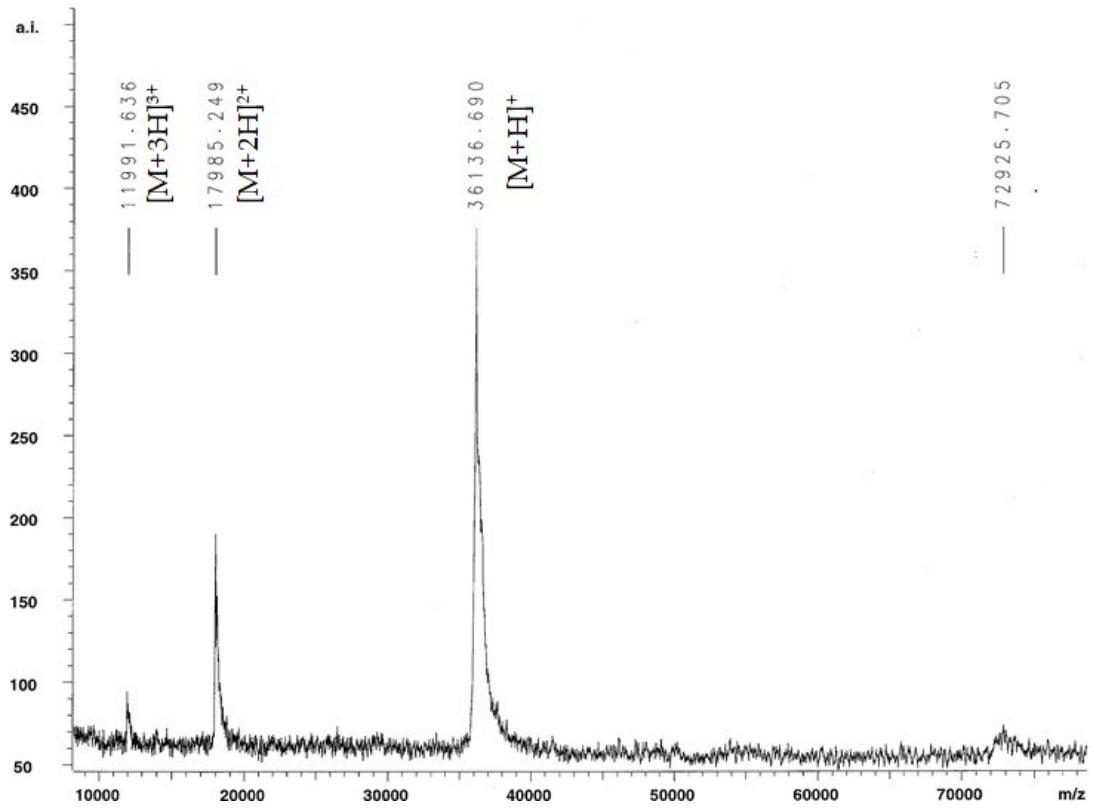
*brasiliensis* -proteiinikandidaatille. Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetulle molekyylipainoltaan pienemmälle proteiinille 10 peptidiä 39:stä vastasi tietokannan kumipuun peptidimassoja ja sekvenssikattavuus oli näissä 39–43 %. Kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetun pienemmän proteiinin peptideistä 15/38 osui tietokannassa oleviin laskennallisiin peptidimassoihin kattavuuden ollessa parhaimmillaan 62–69 %. Molekyylipainoltaan suuremmalle, geelisuodatuksella ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetulle proteiinille parhaimmat tulokset antoivat liitteen 3 mukaiset noin 41,5 kDa proteiinikandidaatit, joissa MALDI-TOF-massaspektrometrialla määritetyistä 24 peptidistä 15 vastasi tietokannan antamiin massoihin proteiinisekvenssin kattavuuden ollessa 56 %.

#### 4.4 Hevb2-proteiinin karakterisointi

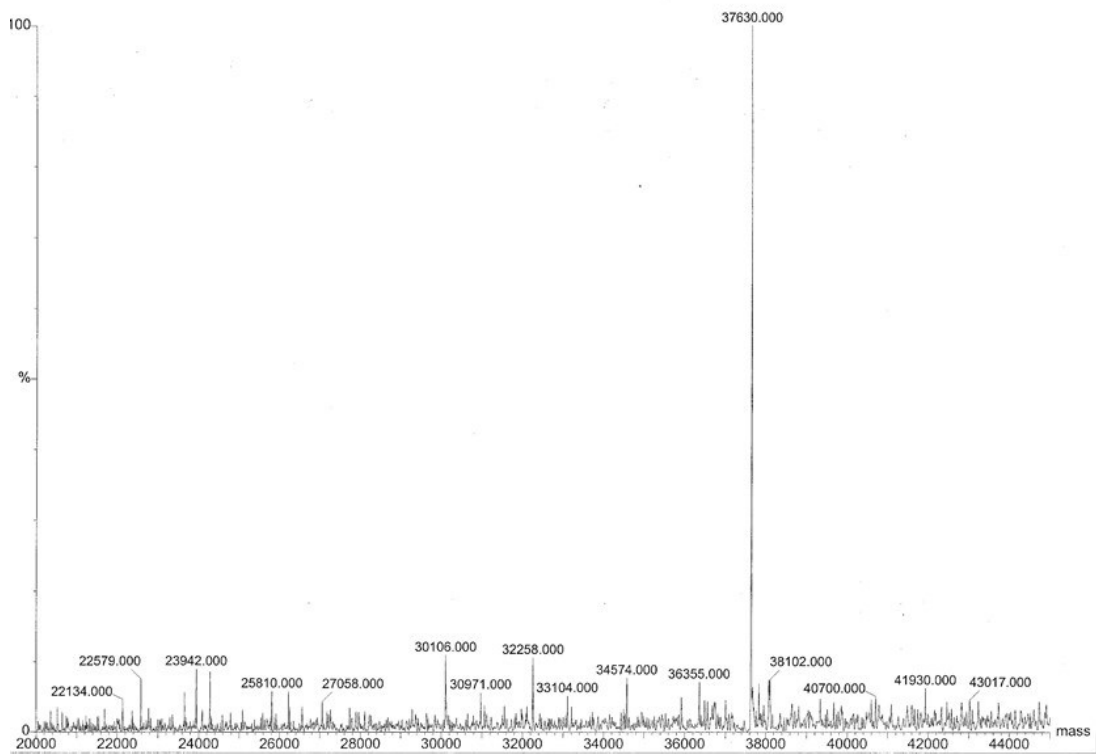
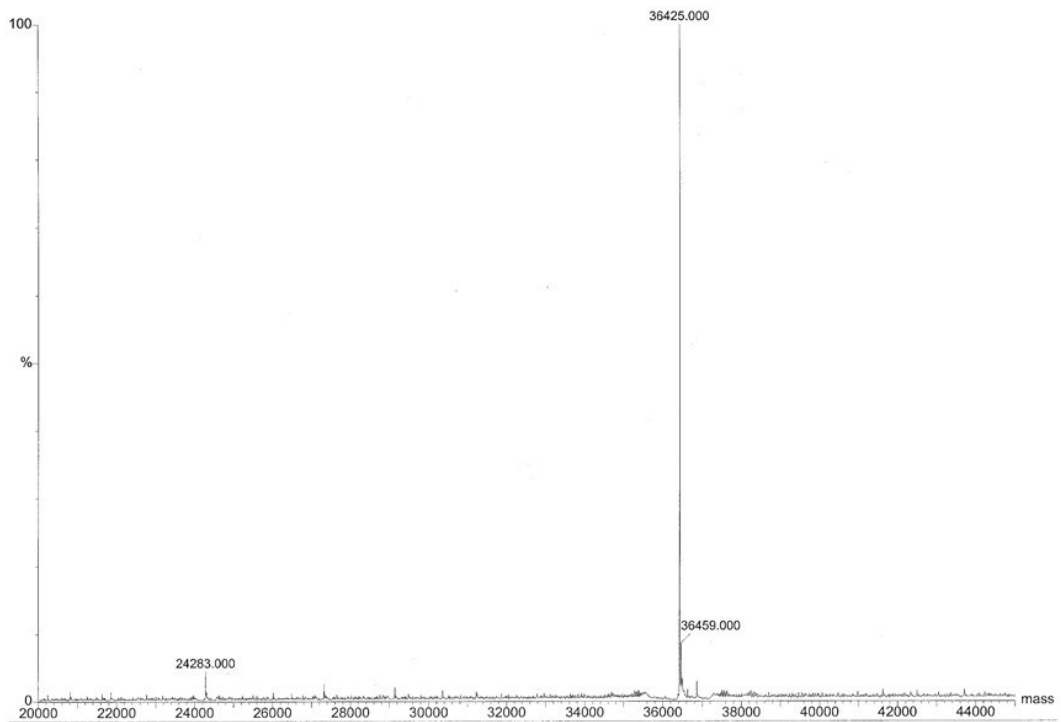
##### 4.4.1 Molekyylipainon määrittäminen (MALDI-TOF MS ja ESI MS)

Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografiapuhdistuksissa saatiin eroteltua molekyylipainoltaan kahta, lähes samansuuruisia proteiinia, joiden molempien molekyylipainot määritettiin RP-fraktioista massaspektrometrisesti. MALDI-TOF-massaspektrometrillä analysoitaessa molekyylipainoiksi saatiin 36,1 ja 37,7 kDa (kuva 3A) ja vastaavasti herkemmällä ja spesifisemmällä ESI Q-TOF -massaspektrometrillä 36,4 ja 37,6 kDa (kuva 3B). 36,1 kDa kokoisen proteiinin MALDI-TOF-massaspektrissä molekyylipainoltaan pienempi proteiini esiintyi niin yhdesti, kahdesti kuin kolmesti varautuneena ja ionisaatiossa syntynyt dimeeri ( $m/z$  72925,705), joka johtuu pelkistävästä olosuhteista, oli havaittavissa spektrissä. Liitteessä 4 on lisäksi esitetty kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistettujen proteiinien Q-TOF-massaspektrit.

A)



B)



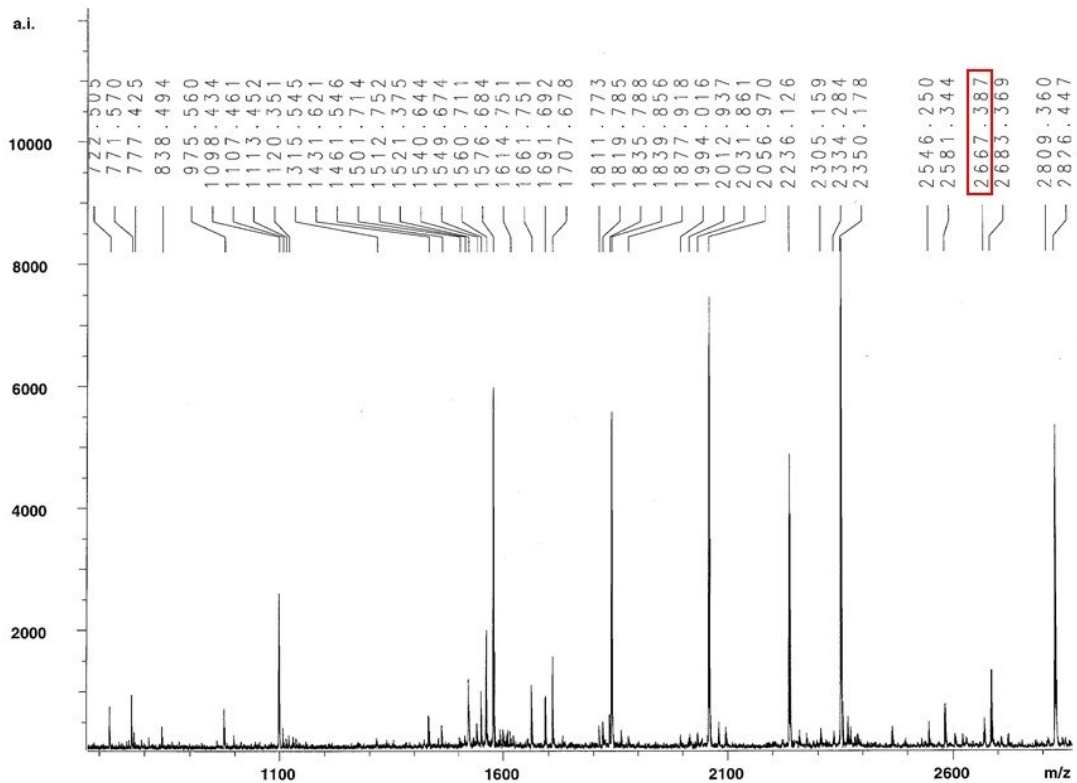
Kuva 3. A) Proteiinin molekyylipainojen määrittäminen MALDI-TOF MS ja B) ESI MS -menetelmällä.

#### 4.4.2 Proteiinin N-terminaalinen sekvensointi sekä N-terminaalisen peptidin analysointi (MALDI-TOF MS) ja sekvensointi (ESI MS/MS)

Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistettujen proteiinien Edman degradaatioon perustuva N-terminaalinen sekvenssianalyysi osoitti proteiinien N-terminaaliset päät blokatuiksi, sillä sekvensointi ei antanut tulosta.

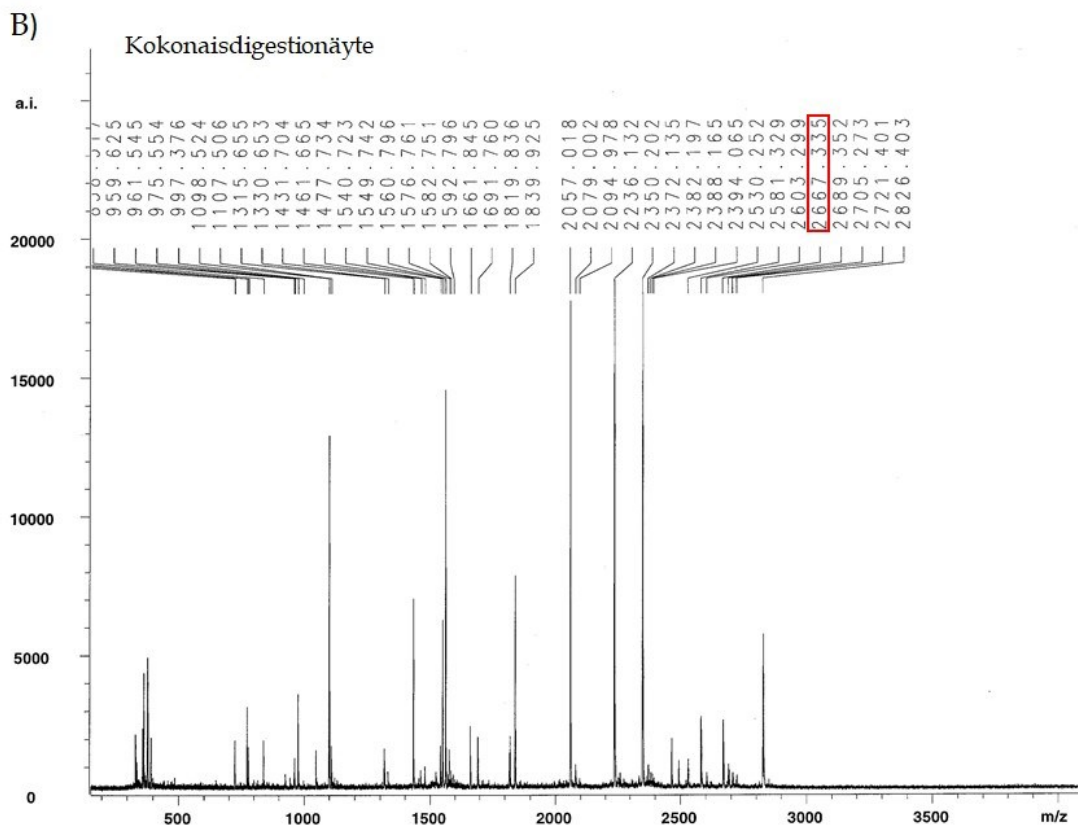
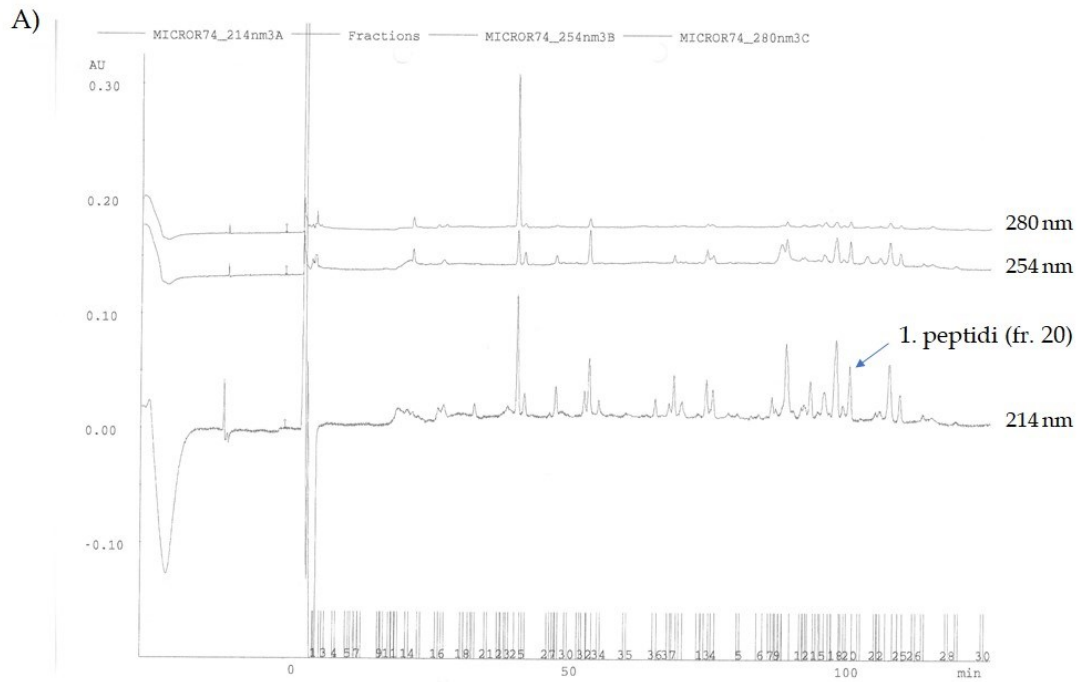
Koska menetelmällä ei saatu sekvenssiä, molekyylipainoltaan pienemmän proteiinin käänteisfaasikromatografiafraktiolle tehtiin alkylointi ja entsymaattinen digestio trypsiinillä ja molekyylipainoltaan suuremmalle vain entsymaattinen digestio. Saatujen peptidien massat määritettiin MALDI-TOF-massaspektrometrialla. Analyysin perusteella N-terminaalinen pää osoitettiin 36,4 kDa Hevb2-proteiinin kohdalla olevan blokatu, sillä MALDI-TOF-massaspektrin piikki  $m/z$  2667 (kuva 4) vastasi 4-vinyylipyridiinillä (4-VP) alkyloidun ja trypsiinillä digestoidun proteiinin N-terminaalisen peptidin laskennallista massaa, kun glutamiinista (Q) on muodostunut pyroglutamiinihappo (liite 5). N-terminaalisen peptidin laskennalliseksi massaksi saadaan 2579, kun ensimmäisenä aminohappona ketjussa on glutamiini. Kun glutamiinista muodostuu pyroglutamiinihappo, peptidin laskennallinen massa on 2562 (massaero -17). Kun lisäksi N-terminaalisisessa peptidissä on proteiinin ainoa kysteiniaminohappo, joka on käsitelty 4-VP:llä (kysteiniin pyridylylietylaatio), lisää se peptidin massaa vielä +105, jolloin syklisellä pyroglutamiinihapolla blokatun N-terminaalisen peptidin laskennalliseksi massaksi saadaan 2667.

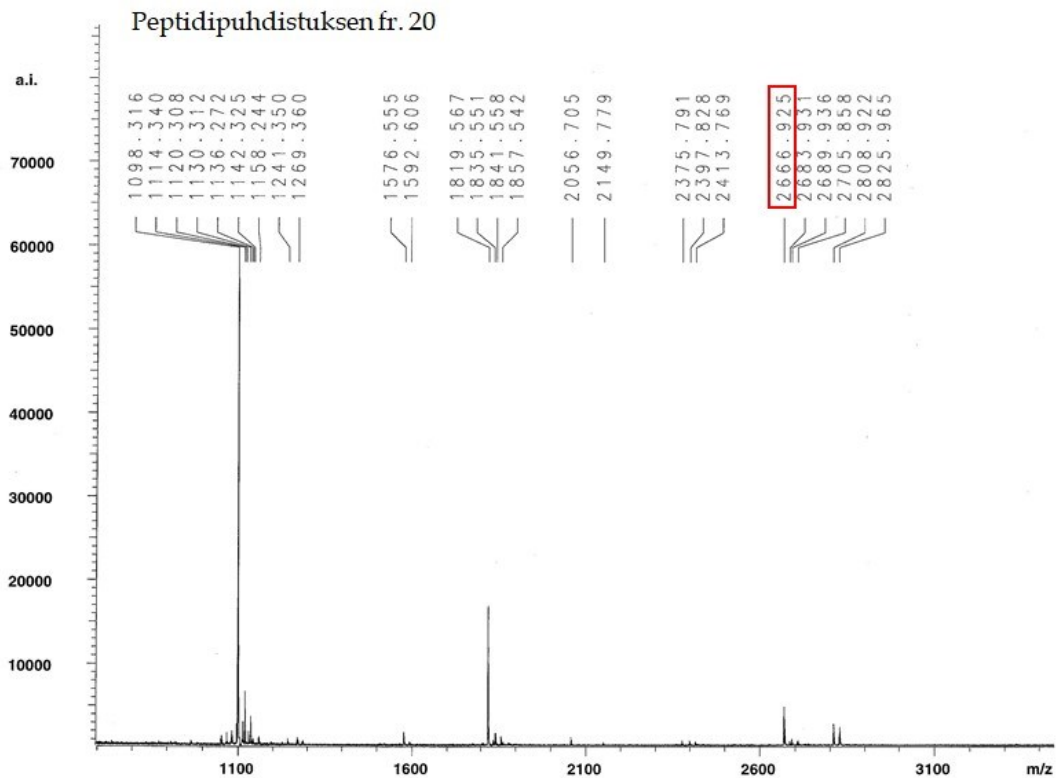
Digestoidun 37,6 kDa proteiinin massaspektristä ei havaittu sellaista 1. peptidin monoisotooppista massaa, joka olisi osoittanut vastaavasti syklisen pyroglutamiinihapon. Koska proteiinia ei oltu alkyloitu 4-VP:llä, olisi massaspektrissä pitänyt näkyä piikki  $m/z$  2562. Molekyylipainoltaan suuremman Hevb2-proteiinin kohdalla jäi epäselväksi, mikä N-terminaalisen pään blokkautumisen aiheutti.



Kuva 4. Entsymaattisesti digestoidun 36,4 kDa proteiinin peptidien massasormenjälkien analysointi MALDI-TOF MS -menetelmällä.

N-terminaalisen, blokatun peptidin sekvensoimiseksi ESI MS/MS -menetelmällä 36,4 kDa proteiinin kationinvaihtokromatografiافرaktiosta ajettiin näyte C1-käänteisfaasikromatografiapylväällä ja alkyloinnin sekä liuosdigestion jälkeen peptidit eroteltiin edelleen C8-käänteisfaasikromatografiapylväällä SMART HPLC -laitteistolla (kuva 5A). Kokonaisdigestionäyte sekä erotellut peptidifraktiot analysoitiin MALDI-TOF MS -menetelmällä m/z 2667 peptidin löytämiseksi (kuva 5B).





Kuva 5. A) 36,4 kDa proteiinin liuosdigestoitujen peptidien erottelu C8-käänteisfaasipylväällä lineaarisella ACN-gradientilla (0–40 % 120 min) 0,1 % TFA:ssa virtausnopeudella 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  sekä B) peptidien analysointi MALDI-TOF MS -menetelmällä.

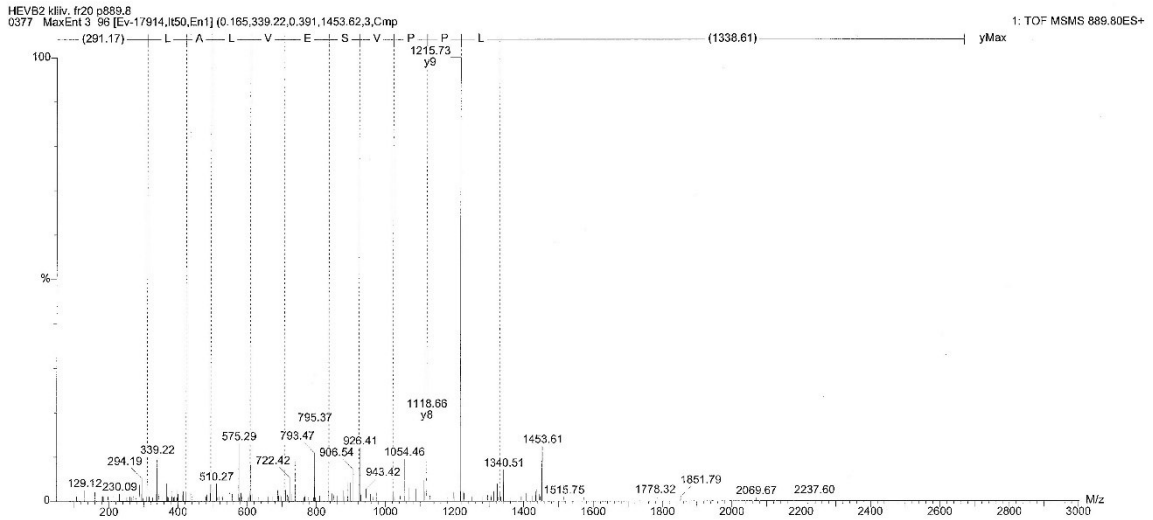
Peptidifraktio 20 sisälsi suurimman osan 36,4 kDa proteiinin N-terminaalista peptidistä ja se valittiin edelleen analysoitavaksi ESI MS/MS -menetelmällä. Sekvenssin lukeminen suoritettiin BioLynx-ohjelmalla (kuva 6). BioLynx-sekvenssianalyysillä saatiin massaspektristä määritettyä suoraan vain osa (harmaalla) 24 aminohappotähteestä koostuvasta N-terminaalisen peptidin sekvenssistä (pyroE)VGVCYGMQGNLPPVSEVIALYK. Sekvenssin lukemisen haastavuuteen saattoi osaltaan vaikuttaa peptidin varaukseton, blokkattu N-terminaalipää. PAWS-tietokoneohjelman avulla, jolla saatiin määritettyä polypeptidiketjun aminohappojärjestys (liite 5) sekä 4-VP:llä alkyloitujen ja trypsiinidigestiolla saatujen peptidien laskennalliset massat, voitiin osa muusta sekvenssistä päätellä BioLynx-ohjelmalla.

## BioLynx - Peptide Sequencing Report

Page 1

PepSeq file:  
Printed: Wed Feb 27 11:47:57 2002Observed MW: 2656.3765 Precursor ion charge state: 1  
M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 15 (0.750%)  
Modifications: Ethylpyridine (+/-)

a	1311.63	1424.71	1521.76	1618.82	1717.88	1804.92	1933.96	2033.03	2146.11	2217.15	2330.23	2621.38
b	1339.62	1452.70	1549.76	1646.81	1745.88	1832.91	1961.95	2061.02	2174.11	2245.14	2358.23	2649.37
	0.03	0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1338.61	Leu	Pro	Pro	Val	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Leu	291.17
y	2667.38	1328.77	1215.69	1118.63	1021.58	922.51	835.48	706.44	607.37	494.29	423.25	310.17
	---	0.00	-0.04	-0.02	-0.01	-0.02	-0.03	-0.03	-0.04	-0.03	-0.02	-0.02
z	2650.35	1311.74	1198.66	1101.60	1004.55	905.48	818.45	689.41	590.34	477.26	406.22	293.14
	---	---	-0.02	---	---	---	---	---	---	---	---	-0.11



Kuva 6. BioLynx-sekvenssianalyysin tulos 36,4 kDa proteiinin N-terminaalisen pään 1. peptidin sekvenssin määrittämiseksi y-ioneista.

#### 4.4.3 Deglykosylaatioanalyysi

Koska 36,4 kDa proteiinin molekyylipaino ei vastannut sellaisen laskennallisen glykosyloimattoman Hevb2-proteiinin (P52407), josta signaalisekvenssi ja propeptidi on poistettu ja N-terminaali blokattu syklisellä pyroglutamiinihapolla, laskennallista massaa 35 072 Da (Palosuo ym. 2008, liite 5), yritettiin N-glykosidaasi F -käsittelyllä selvittää, onko 36,4 kDa proteiini N-glykosyloitunut vai ei. Entsyymidigestiossa käytettiin kationinvaihtokromatografialla puhdistettua 36,4 kDa proteiinia. Myös 36,7 kDa proteiinin mahdollinen N-glykosylaatio selvitettiin vastaavasti. Reaktiotuotteet poistettiin digestion jälkeen C1-käänteisfaasipylväällä ja näytteet analysoitiin ESI MS -menetelmällä proteiinin molekyylipainon selvittämiseksi.

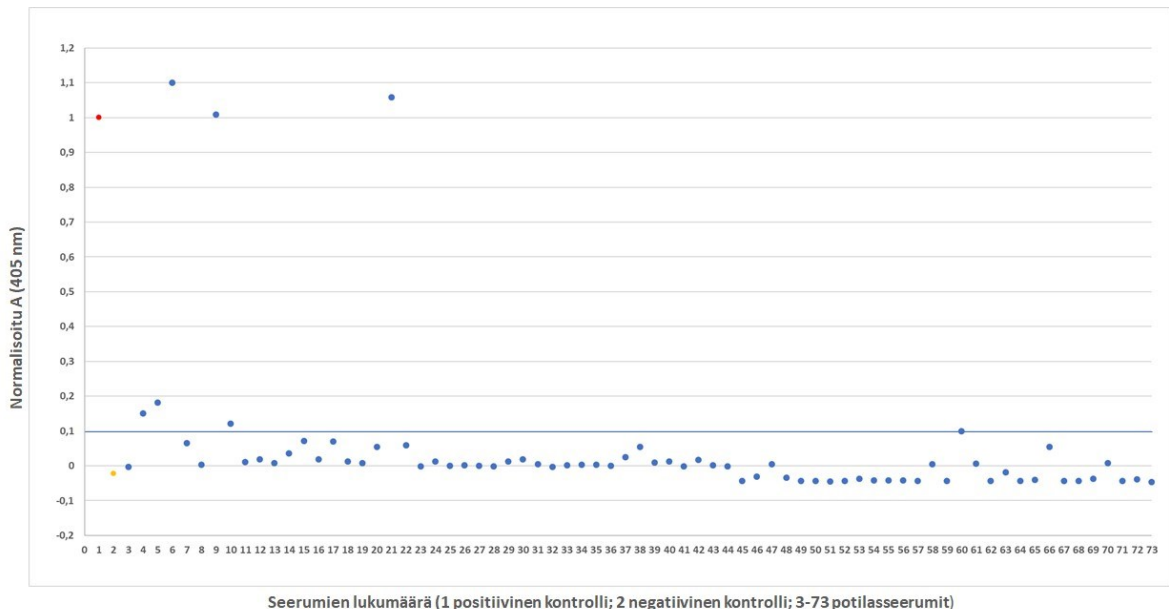


N-glykosidaasi F -käsittely ei muuttanut kummankaan Hevb2-proteiinin molekyyliainetta, joten analyysin perusteella proteiinien mahdollinen N-glykosylaatio jäi osoittamatta.

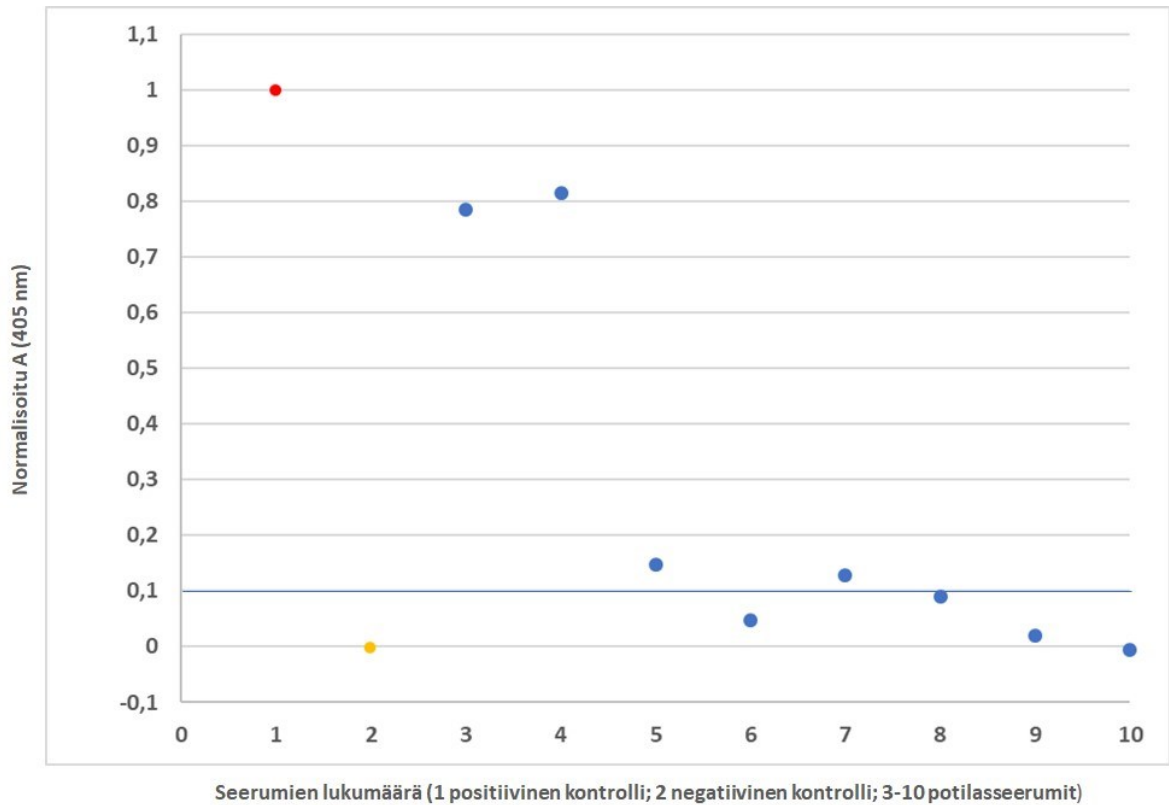
## 4.5 Hevb2-proteiinin immunologiset analyysit

### 4.5.1 IgE-vasta-aineiden osoitus ELISA-menetelmällä

ELISA-kokeessa 7 potilaalla 71:stä (noin 10 %) havaittiin olevan IgE-vasta-aineita 36,4 kDa proteiinia vastaan (kuva 7). Näistä viiden potilaan oli jo aiemmin todettu olevan luonnonkumille allergisia ja muodostavan vähintään yhdelle luonnonkumin allergeeneista (Hevb1, 3, 5, 6, 7) spesifistä vasta-ainetta (liite 1). 37,6 kDa proteiinin kohdalla IgE-vasta-aineita löydettiin neljältä potilaalta kahdeksasta (50 %), joista etukäteen luonnonkumille allergiseksi oli todettu kuusi potilasta (kuva 8). Neljästä positiivisen vasteen antaneesta potilaasta kaikki olivat ennalta luonnonkumiallergisiksi todettuja. Liitteessä 6 on esitetty ELISA-analyysien mittaustulokset (ml. normalisoidut tulokset) niin yksittäisten potilaiden kuin potilasseerumipoolien osalta.



Kuva 7. IgE-vasta-aineiden osoitus potilasseerumeista 36,4 kDa proteiinia vastaan. Positiivisen vasteen raja 0,1 on merkitty kuvaajaan sinisellä vaakaviivalla.

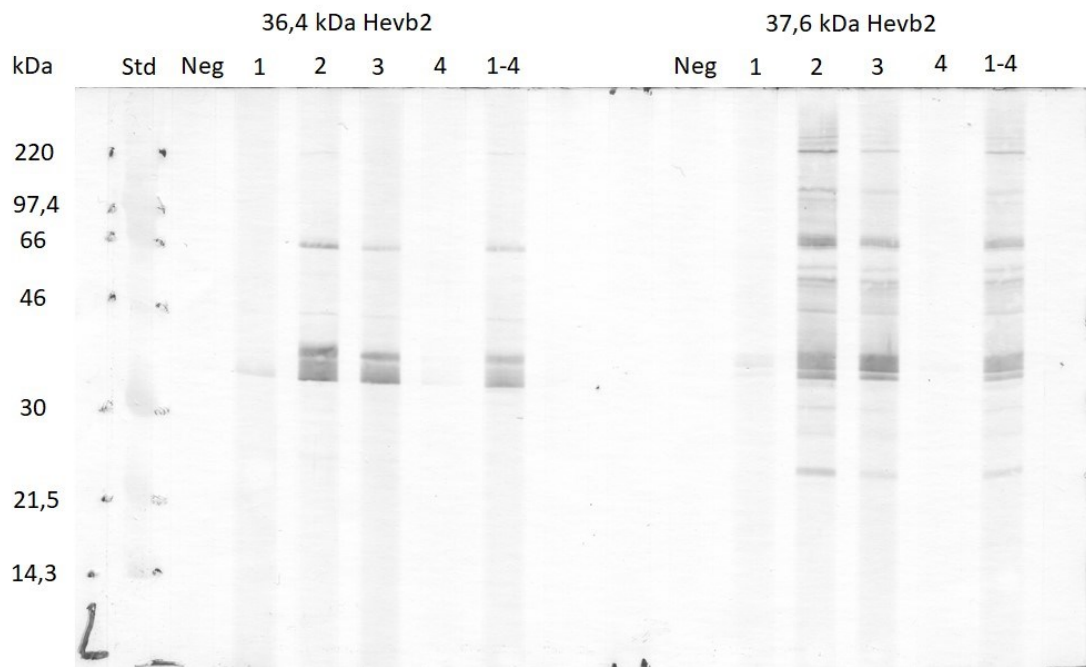


Kuva 8. IgE-vasta-aineiden osoitus potilasseerumeista 37,6 kDa proteiinia vastaan. Positiivisen vasteen raja 0,1 on merkitty kuvaajaan sinisellä vaakaviivalla.

#### 4.5.2 Western blot -analyysi

Immunoblottauksessa kahdella luonnonkumiallergisella potilaalla neljästä havaittiin selvästi IgE-vasta-aineita molempia proteiini muotoja vastaan ja yhdellä heikosti (kuva 9). Kuvan perusteella vasta-aineet sitoutuivat useisiin muihinkin proteiinivyöhykkeisiin, molemmilla proteiini muodoilla erityisesti noin 66 kDa kokoiseen proteiiniin. Puhdistetut isomuodot sisälsivät myös toista isomuotoa vasta-aineen sitoutumisesta päätellen. Analyysi osoitti varsinkin 37,6 kDa Hevb2-proteiininäytteen olleen epäpuhdas ja/tai sisältäneen mahdollisesti

proteiiniaggregaatteja, sillä potilaiden IgE-vasta-aine sitoutui spesifisesti lukuisiin muihin PVDF-kalvon proteiinivyöhykkeisiin.



Kuva 9. Western blot -analyysi neljän luonnonkumiallergisen potilaan seerumien IgE-vasta-aineiden sitoutumisesta puhdistettuihin proteiineihin.

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

Joidenkin luonnonkumin proteiinien tiedetään olevan kliinisesti tärkeitä pääallergeeneja, kuten Hevb6.01 ja Hevb5 sekä Hevb1 ja Hevb3 erityisesti Spina bifida -potilaille (Wagner ja Breiteneder 2005), mutta toisten rooli on yhä edelleen nykypäivänäkin epäselvä ristiriitaisten tutkimustulosten takia, kuten Hevb2 ja Hevb13 (Kurup ym. 2000, Bernstein ym. 2003, Palosuo ym. 2004, Kurup ym. 2005, Palosuo ym. 2007a). Tämä tutkimustyö tehtiin ajankohtana vuonna 2001–2002, jolloin proteiini oli vielä osittain rakenteellisesti karakterisoimatta, ja sen kliinisesti merkitsevää immuunivastetta ei ollut vielä selvitetty laajoilla potilasjoukoilla (Alenius ym. 1995a, Sunderasan ym. 1995, Yagami ym. 1998).

Tutkimuksessa käytettiin kolmea erilaista HPLC-puhdistusmenetelmää. Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografialla, jolla Alenius ym. (1995a) saivat Hevb2-proteiinin eroteltua, saatiin proteiini vastaavasti puhdistettua kromatogrammien ja geelielektroforeesin perusteella hyvin muista B-seerumin sisältämistä proteiineista. 36,4 kDa proteiinin MALDI-TOF-massaspektrissä ei havaittu muita proteiinipiikkejä, mutta toisaalta ESI Q-TOF MS:lla havaittiin varsinkin 37,6 kDa proteiinin kohdalla heterogeenisyyttä, eikä näytteen puhtautta ja sitä, oliko mukana mahdollisesti muita lateksiallergeeneja tässä tarkemmin selvitetty. Aleniuksen ym. (1995a) tutkimustuloksista poiketen proteiinin havaittiin esiintyvän kahtena isomuotona. Isomuodot eluoutuivat RP-pylväästä lähellä toisiaan, joten geelielektroforeesissa ensimmäisenä eluoituva 37,6 kDa Hevb2-proteiini sisälsi vähäisiä määriä myös kooltaan pienempää muotoa. SDS-PAGE:ssa 36,4 kDa proteiinin alla juuri erottuva erillinen kolmas proteiinivyöhyke tunnistettiin trypsiinillä tehdyn geelidigestion jälkeen hyvällä osumatarkkuudella peptidimassasormenjälkien perusteella ProFound-tietokantahakuohjelmassa samaksi liitteen 3 molekyylipainoltaan 36,4 kDa kokoiseksi *Hevea brasiliensis* -proteiinikandidaatiksi AAG24921 (ei esitetty tuloksissa). Vastaavaa vyöhykettä ei sen sijaan enää havaittu kationinvaihtokromatografialla puhdistetun

Hevb2-proteiinin SDS-PAGE:ssa. Kahdessa aikaisemmassa tutkimuksessa, jossa Hevb2-proteiinia puhdistettiin B-seerumista, osoitettiin ConA-affiniteetikromatografialla ja/tai pelkistävän SDS-PAGE-tuloksen perusteella proteiinin esiintyvän kahtena eri isomuotona (Churngchow ym. 1995, Sunderasan ym. 1995), mutta toisaalta Yagami ym. (1998, 2002) havaitsivat, että ei-ammonioidusta lateksista voitiin erottaa SDS-PAGE:lla saostuksen, geelisuodatus- ja anioninvaihto- sekä ConA-affiniteettipuhdistuksen jälkeen kolme isomuotoa. Myöhemmissä tutkimuksissa on lutoidihomogenaatin dialysoinnin jälkeisestä sakasta saatu geelisuodatus-, affiniteetti- ja ioninvaihtokromatografialla eroteltua kaksi Hevb2-isomuotoa (Fuentes-Silva ym. 2007).

Geelisuodatus- ja denaturoivalla käänteisfaasikromatografialla puhdistettu Hevb2-proteiini yritettiin vakuumisentrifuugikuivauksen jälkeen liuottaa ELISA-immunomääritykseen sopivalla puskurilla, kuten 50 mM Na-karbonaatti, pH 9,6 tai PBS. Liuotetun proteiinin analyttinen ajo RP-pylväällä osoitti kuitenkin, ettei proteiinin liuotus onnistunut toivotulla tavalla. Vastaavasti puskurinvaihtokokeilu parilla eri geelisuodatusmateriaalia sisältävällä pylväällä ei tuonut myöskään toivottua tulosta, sillä ajon kromatogrammeissa tai fraktionäytteiden SDS-PAGE-analysissä ei proteiinia juuri havaittu (ei esitetty tuloksissa).

Denaturoiminen saa aikaan proteiinin polypeptidiketjun sisältämien aminohappojen hydrofobisten sivuketjujen paljastumisen ja mahdollisesti aggregaattien muodostumisen. Proteiinin pinnan hydrofobisuus lisää muodostuvien proteiiniaggregaattien tiheyttä. Tällöin proteiinin uudelleenliuotus on vaikeampaa eikä aggregoitunut proteiini kykene palautumaan enää denaturoituneeseen tilaan ja edelleen natiiviin laskostuneeseen muotoonsa. Yagami ym. (2002) ovat havainneet, että puhdistetut  $\beta$ -1,3-glukanaasi-isoentsyymit aggregoituvat helposti olosuhteissa, joissa on matala ionivahvuus. Proteiinin aggregoituessa sen immunogeenisyys eli kyky aiheuttaa immunologinen vaste voi muuttua. Vaikka käänteisfaasikromatografialla voi olla vaikutusta proteiinin rakenteisiin, on huomioitava, että lateksituotteiden valmistusprosessin aikana

luonnonkumin proteiinit käyvät läpi erittäin denaturoivat valmistusolosuhteet ja siksi on syytä olettaa, että tässä denaturoivan puhdistusvaiheen jälkeenkin relevantit allergeeniset epitoopit säilyttävät niiden reaktiivisen muotonsa. On myös mahdollista, että tapahtuneen kuivauksen aikana proteiini tarttui tiukasti kiinni eppendorf-putken seinämiin ja näin esti proteiinin liukenemisen haluttuun puskuriin.

Eri HPLC-puhdistusmenetelmiä kokeilemalla parhaimmaksi menetelmäksi Hevb2-proteiinin puhdistamiseksi B-seerumista osoittautui kuitenkin ei-denaturoiva kationinvaihto- ja geelisuodatuskromatografia, jolla proteiinia saatiin puhdistettua riittäviä määriä myös ELISA-immunomääritykseen soveltuvassa puskurissa. Geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografiapuhdistus soveltui kuitenkin hyvin RP-pylvään denaturoivasta luonteesta huolimatta proteiinin karakterisoimiseen, sillä mm. massaspektrometriä analyysijä varten proteiininäyte tulee saada helposti haihtuvaan liuokseen.

Käytettyä kationinvaihtopuhdistusmenetelmää vielä optimoimalla ja mm. ajopuskurin pH:ta happamammaksi alentamalla olisi ollut mahdollista saada molemmat proteiini-isomuodot vielä paremmin erottumaan toisistaan, vaikka kationinvaihtopuhdistuksen jälkeinen analyttinen käänteisfaasikromatografia-ajo sekä puhdistettujen proteiininäytteiden analysointi SDS-PAGE:lla osoitti niiden homogeenisuuden. Työssä jäi tarkemmin selvittämättä, mitä ESI Q-TOF -massaspektreissä havaitut noin 300–400 massayksikköä puhdistettuja isomuotoja suuremmat piikit olivat (liite 4). Vaikka 36,4 kDa Hevb2-proteiini näytti jo pelkän kationinvaihtokromatografian perusteella varsin puhtaalta, puhdistettiin sitä edelleen geelisuodatuksella, jotta varmasti päästiin eroon mahdollisesti mukana olevasta heveiinistä (Hevb6.02), jonka on havaittu kontaminoivan muita lateksiproteiineja ja häiritsevän hyvin pieninä pitoisuuksina vastaainemäärityksissä (Palosuo ym. 2008). Palosuo ym. (2007a) käyttivät samaa puhdistusmenetelmäyhdistelmää myöhemmin, kun he tutkivat laajalla

potilasjoukolla Hevb2-allergeenille spesifisen IgE-vasta-aineen yleisyyttä suomalaisilla, espanjalaisilla ja amerikkalaisilla luonnonkumiallergisilla potilailla.

Käytettyjen puhdistusolosuhteiden ei havaittu suosivan toista isomuotoa, sillä niiden intensiteettieron, jossa molekyylipainoltaan pienempää oli määrällisesti enemmän, vahvistettiin pysyvän samana, kun B-seerumia ajettiin SDS-PAGE:lla myös sellaisenaan (ei esitetty tuloksissa). Churngchow ym. (1995) ja Subroto ym. (2001) osoittivat eri puukloonien välisen intensiteettieron isomuotojen välillä. Kloonissa RRIM600 havaittiin niiden suhteen olevan noin 4:1, kun taas esimerkiksi kloonissa GT1 pienempää isomuotoa oli huomattavasti vähemmän suhteessa suurempaan. GT1-kloonin lateksin havaittiin sisältävän muihin klooneihin verrattuna myös selvästi korkeamman  $\beta$ -1,3-glukanaasipitoisuuden.

Proteiinin PMF-analyysit (engl. peptide mass fingerprinting) sekä 36,4 kDa proteiinin N-terminaalisen peptidin sekvenssianalyysi vahvistivat puhdistettujen proteiinien olevan Hevb2-proteiineja. Hevb2-proteiinin tunnistamisessa on myöhemmissä tutkimuksissa käytetty myös saatavilla olevaa monoklonaalista anti-Hevb2-vasta-ainetta (Palosuo ym. 2007a). Proteiininäytteen puhtauden varmistamiseksi olisi PMF-analyysin tietokantahaku voitu toistaa myös tunnistamattomilla peptidimassoilla ja selvittää, onko mukana luonnonkumin muita allergeeneja. Vastaavasti nykyään saatavilla olevilla anti-Hevb-vasta-aineilla olisi myös voitu saada selville, oliko näytteissä yhä puhdistuksesta huolimatta vähäisiä määriä muita luonnonkumiallergeeneja, jotka eivät mahdollisesti näkyneet käytetyissä proteiinkemiallisissa tekniikoissa (Palosuo ym. 2007a, 2008). Aikaisemmin on osoitettu, että osittain epäpuhtaan Hevb2-näytteen joukossa on havaittu heveiin lisäksi myös muita lateksiallergeeneja tai niiden fragmentteja, kuten Hevb5 ja joissakin tapauksissa myös Hevb1, kun näytteet analysoitiin vielä kaupallisella FITkit-testillä (Palosuo ym. 2007a).

Aiemmissä tutkimuksissa Hevb2-proteiinin kahden eri isomuodon molekyylipainot oli arvioitu vain geelielektroforeesin perusteella karkeasti

(Churngchow ym. 1995, Sunderasan ym. 1995). Yagami ym. (1998), jotka havaitsivat kolme eri isomuotoa, saivat niiden molekyylipainoiksi MALDI-TOF MS:lla 35,1, 36,7 ja 38 kDa. Fuentes-Silva ym. (2007) puhdistivat GV-42 kloonista kaksi isomuotoa, joiden molekyylipainoiksi MALDI-TOF-analyysissä he määrittivät 38 397 ja 38 093 Da. ESI Q-TOF MS:lla saatiin tässä tutkimuksessa määritettyä isomuotojen tarkoiksi molekyylipainoiksi 36 425 ja 37 630 Da (kationinvaihto- ja käänteisfaasipuhdistuksen jälkeen vastaavasti 36 423 ja 37 631 Da). ESI MS:lla on mahdollista päästä jopa 1 Da tarkkuuteen riippuen proteiinista ja erityisesti näytteen homogeenisyydestä, kun taas käytetyllä MALDI-TOF MS:lla, jossa proteiinin massatarkkuus riippuu sen koosta, tarkkuus on tyypillisesti välillä 50–300 Da. MALDI-TOF-massaspektrien perusteella proteiinien massat erosivat herkemmän ESI Q-TOF -massaspekttrin vastaavista tuloksista noin 100–300 Da. Palosuo ym. (2007a, 2008) saivat vastaavasti kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografian jälkeen Hevb2-proteiinin ESI Q-TOF -massaspektrometrisissä analyyseissä isomuotojen massoiksi 36 432 ja 37 628 Da. He käyttivät tutkimuksessaan puukloonin RRIM600 ei-ammonioidusta lateksista saatua B-seerumia. Eri kloonien välillä tiedetään olevan eroja niin  $\beta$ -1,3-glukanaasien kuin N-glykaanien määrissä (Subroto ym. 2001), ja vaikka tässä työssä ei tarkka puukloonin ollutkaan selvillä, voidaan sen massaspektrometriatulosten (Palosuo ym. 2007a) sekä eri kloonien isomuotojen suhdelukujen (Subroto ym. 2001) perusteella olettaa olevan peräisin myös kloonista RRIM600.

Tutkimuksessa saatiin osoitettua 36,4 kDa Hevb2-proteiinin N-terminaalisen blokkautumisen aiheutuvan syklisestä pyroglutamiinihaposta. Vastaavasti Hevb2-proteiinin N-terminaalisen blokkautumisen havaitsivat jo aiemmissa tutkimuksissaan Sunderasan ym. (1995), Subroto ym. (1996) ja Yagami ym. (1998), mutta Rodríguez-Romero ym. (2014) osoittivat sen myöhemmin aiheutuvan syklisestä pyroglutamiinihaposta.

Saatujen isomuotojen massat olivat suurempia kuin proteiinin laskennallinen massa ei-glykosyloidusta Hevb2-proteiinista, josta signaalisekvenssi on poistettu,



joka sisältää N-terminaalissa syklisten pyroglutamiinihapon ja ei sisällä C-terminaalin potentiaalista 22 aminohapon pituista propeptidiä (liite 5). Aiemmissä tutkimuksissa on osoitettu, että eri kloonien isomuodot voivat olla eri asteisesti glykosyloituneita tai glykosyloimattomia ja mm. kumipuukloonissa RRIM600 on havaittu molempia (Churngchow ym. 1995, Subroto ym. 2001, Yagami ym. 2002, Fuentes-Silva ym. 2007, Rodríguez-Romero ym. 2014). Massaero laskennalliseen massaan voi selittyä yhden tai useamman glykaanin mukanaololla, joka osoittaisi, että kaksi Hevb2-proteiinin muotoa olisivat posttranslacionaalisesti modifioitu. Toisaalta 37,6 kDa proteiinin massa vastaa myös sellaisen ei-glykosyloituneen ja N-terminaalisesti ei-blokaten Hevb2-prekursoriproteiinin massaa, joka sisältää propeptidin (liite 5), mutta koska proteiinin N-terminaalinen sekvensointi kuitenkin osoitti proteiinin N-terminaalipään blokatuksi, on tämä oletamus hyvin epävarma.

Monet allergeeneista ovat luonteeltaan heterogeenisiä ja esiintyvät monilukuisina molekyylivariantteina eli isomuotoina (Yeang 2008). Hevb2-isomuodot johtuvat joko vaihtoehtoisesta mRNA-prosessoinnista tai proteiinisynteesin jälkeisistä muutoksista, kuten eroista glykosylaatioissa, proteolyttisessä prosessoinnissa tai deaminaatioissa (Palosuo ym. 2008). Koska eri Hevb2-isomuotojen on osoitettu eri tutkimuksissa sisältävän N-glykaaneja, on todennäköistä, että puhdistetuissa isomudoissa niitä myös on. Deglykolysoinnilla yritettiin selvittää isomuotojen mahdollista N-glykosylaatiota. Apotransferriini-standardilla tehdyissä kokeissa näytteenkäsittely osoittautui hankalaksi ja vain ilman detergenttejä (SDS, n-oktyyli- $\beta$ -D-glukosidi) tehdyllä reaktiolla voitiin proteiinistandardin deglykosylaatio osoittaa tapahtuneen. Standardinäytettä ei saatu analysoitua lainkaan MALDI-TOF MS:lla, kun detergentit olivat reaktiossa mukana, ja tämän katsottiin johtuvan siitä, että reaktion jälkeisellä käänteisfaasipuhdistuksella ei päästy kokonaan eroon massaspektrometreille haitallisesta SDS:stä. Entsyymivalmistajan ohjeiden mukaan proteiinin denaturointi yhdessä SDS:n kanssa lisää merkittävästi deglykosylaatiota ja n-oktyyli- $\beta$ -D-glukosidi -lisäys on välttämätön, jotta SDS ei inaktivoisi N-

glykosidaasi F -entsyymiä. Koska Hevb2-proteiinin deglykosylointi tehtiin ilman detergenttejä, on todennäköistä, että reaktio epäonnistui ja proteiinin sisältämien N-glykaanien läsnäoloa ei saatu siksi vahvistettua.

ELISA-immunomäärityksen perusteella 36,4 kDa Hevb2-proteiini ei vaikuttaisi olevan merkittävä allergeeni, sillä vain noin 10 % potilaista (< 50 %) löytyi sille spesifistä IgE-vasta-ainetta (King ym. 1995). Vaikka 37,6 kDa isomuodon kohdalla ELISA:ssa potilaista 50 %:lla havaittiin spesifistä IgE:tä, ei tulosta voida pitää luotettavana vähäisen potilasjoukon takia (n=8). 36,4 kDa proteiini-isomuodon ELISA-määritys tehtiin 73 potilasseerumilla, joten tulos antaa luotettavamman kuvan allergeenispesifisen IgE-vasta-aineen yleisyydestä suomalaisten potilaiden seerumeissa. Muutamissa *in vitro* -analyysissä on proteiini osoitettu merkittäväksi allergeeniksi, mutta tulosten luotettavuutta niissä heikentää tutkimuksissa käytettyjen potilasnäytteiden vähäinen lukumäärä (Kurup ym. 2000, 2005). Toisissa laajemmissa *in vivo* tai *in vitro* -tutkimuksissa puhdistettu Hevb2-proteiini antoi positiivisen vasteen yli 50 % luonnonkumiallergisiksi todetuilla terveydenhuollon työntekijöillä (Bernstein ym. 2003, Raulf-Heimsoth ym. 2007). Merkille pantavaa kaikissa näissä tutkimuksissa, joissa Hevb2-proteiinin osoitettiin olevan merkittävä allergeeni, on se, että niissä on käytetty samaa vain yhden laboratorion käyttämää puhdistusmenetelmää (Sunderasan ym. 1995). Palosuon ym. (2004, 2007a) myöhemmin käyttämällä puhdistusmenetelmällä, joka vastasi tässä tutkimuksessa käytettyä menetelmää, saatiin osoitettua, ettei kunnolla puhdistettu natiivi-Hevb2-proteiini ollut merkittävä allergeeni luonnonkumiallergisilla potilailla.

Saadut tutkimustulokset eivät toisaalta ole täysin vertailukelpoisia muiden julkaisemien tulosten kanssa, sillä tässä isomuodot eroteltiin puhdistuksessa toisistaan ja analysoitiin ELISA:lla erikseen sen sijaan, että ne olisi yhdistetty. 36,4 kDa Hevb2-isomuoto puhdistettiin sekä kationinvaihto- että geelisuodatuskromatografiolla, mutta 37,6 kDa isomuodon kationinvaihtokromatografiolla puhdistettua fraktiota käytettiin sellaisenaan ilman geelisuodatuspuhdistusta ja puskurinvaihtoa, sillä alun perin IgE-määritys oli

tarkoitus tehdä vain pienemmällä proteiinin isomuodolla. Yeang (2008) on tuonut esille, että heterogeenisiä eli niitä allergeeneja, jotka esiintyvät monina isomuotoina, on mahdollista puhdistaa liikaa, jolloin osa potentiaalisesti tärkeistä IgE:tä sitovista isomuodoista menetetään. Kaikista julkaistuista tutkimustuloksista ei käy välttämättä ilmi, minkälaista proteiinimolekyyliä on *in vivo* -kokeissa tai *in vitro* -serologisissa testeissä käytetty, mutta vastineessaan Yeangin (2008) epäilylle Palosuo ym. (2008) osoittivat ja vahvistivat, ettei heidän käyttämässään kationinvaihto- ja geelisuodatuspuhdistusmenetelmässä hävitetty eri isomuotoja, vaan ne molemmat olivat vasta-ainemäärityksessä mukana osoittamassa IgE:n spesifistä sitoutumista proteiiniin.

Saadut ELISA-tulokset erosivat muiden vastaavista myös siinä, että tässä käytettiin pääasiassa määrittelemätöntä potilasjoukkoa, kun muut tutkimukset perustuivat ennalta tarkasti valikoituun, monilla varmistetuilla menetelmillä luonnonkumiallergisiksi diagnosoituun potilasjoukkoon ja kontrollijoukkoon, joiden tiedettiin olevan esimerkiksi atooppisia, positiivisia yhdelle tai useammalle alueelliselle aero- eli hengitysilmassa leviävälle allergeenille, luonnonkumituotteelle altistuneita, negatiivisia luonnonkumin ihopistokokeessa tai joilla ei kliinisiä oireita ollut (Kurup ym. 2000, Bernstein ym. 2003, Kurup ym. 2005, Palosuo ym. 2007a, Raulf-Heimsoth ym. 2007). Muutamissa vasta-ainemäärityksissä oli myös selvitetty joidenkin potilaiden reaktiohistoriaa ristireaktioita aiheuttavista ruoka-allergeeneista (Kurup ym. 2000, Wagner ym. 2004, Kurup ym. 2005, Raulf-Heimsoth ym. 2007). Toisin kuin muissa tutkimuksissa tässä jouduttiin ELISA-analyysissä käyttämään minimi-maksimi-normalisointia eri mittauksista saatujen tulosten yhdistämiseksi sekä positiivisena vasteena itse määritettyä raja-arvoa 0,1 standardinäytteiden vähyyden takia, kun yleensä positiivisen vasteen raja-arvona käytetään OD:tä (engl. optical density), joka on kontrollinäytteistä laskettu keskiarvo lisättynä kolminkertaisella keskihajonnalla.

Immunologisiin analyyseihin puhdistetut Hevb2-proteiinin isomuodot eivät olleet käytettyjen proteiinikemiallisten menetelmien perusteella erityisen epäpuhtaita.

Immunoblotissa, erityisesti 37,6 kDa osalta, näyte vaikutti kuitenkin varsin epäpuhtaalta eikä tässä selvitetty, olivatko muut proteiinivyöhykkeet muita lateksiallergeeneja ja/tai allergeenifragmentteja tai -aggregaatteja. 37,6 kDa Hevb2-proteiinia ei tässä puhdistettu edelleen geelisuodatuksella kuten pienempää isomuotoa, joten sillä saattoi olla myös vaikutusta näytteen epäpuhtauteen. Immunoblottauksen heikkoutena voidaan pitää, että hyvin pienikokoiset molekyylit, kuten esimerkiksi mahdollisesti yhdessä puhdistuva ja kontaminaatiota aiheuttava Hevb6.02-lateksiproteiini (4,7 kDa), ajautuvat ulos geeliltä ja niiden mukana oloa ei analyysissä voida varmentaa esimerkiksi monoklonaalisilla vasta-aineilla.

Tutkimus paljasti uutta tietoa Hevb2-proteiinin fysikaaliskemiallisista ominaisuuksista sekä immunologisesta vasteesta. Nestekromatografisilla puhdistusmenetelmillä on mahdollista saada tuotettua hyvin puhdistettua allergeenia, ja tässä tutkimuksessa saatiinkin kehitettyä menetelmä, joka pienellä optimoinnilla ja puhtauden varmistamisella soveltuu hyvin natiivin allergeenin tuottamiseen ja sen käyttöön niin *in vitro* -serologisissa määrytyksissä kuin *in vivo* -testivalmisteissa luonnonkumiallergian diagnostiikassa. Hyvin puhdistettua natiivia allergeenia voidaan käyttää monoklonaalisten tai polyklonaalisten vasta-aineiden tuottamisessa ja niiden hyödyntämisessä mm. lateksituotteiden sisältämien allergeenien detektoimisessa tai näytteen puhtauden varmistamisessa. Yhdistelmä-DNA-tekniikalla on mahdollista tuottaa myös kloonatuista allergeeneista suuria määriä rekombinanttiproteiineja, mutta niiden heikkoutena natiiviallergeeneihin verrattuna on, ettei tuottoisäntä välttämättä mahdollista translaation jälkeisten modifikaatioiden syntymistä tai allergeenin oikeanlaista laskostumista, ja ne vaativatkin usein validoinnin natiiviallergeenilla ennen niiden laajempaa käyttöä allergiatestivalmisteina. Jos allergeenin IgE:tä sitova epitooppi on laskostunut (konformationaalinen), kuten B-soluepitooppien tiedetään yleisesti olevan, on validoimattomia rekombinanttiallergeeneja allergiatutkimuksissa ja diagnostiikassa käytettäessä vaarana väärin negatiivisten

tulosten saaminen. Toisaalta myös väärin positiivisten tulosten mahdollisuus tulisi tutkimuksissa huomioida ja sulkea pois. Vääriä positiivisia tuloksia voivat aikaansaada mm. ristiallergiaa aiheuttavien kasvikunnan allergeenien (luonnonkumi, siitepöly, ruoka-aine) samankaltaiset peptidi- tai hiilihydraattirakenteet, jolloin testissä muille kuin tutkitulle allergeenille herkistynyt potilas voi antaa positiivisen vasteen. Vääriä positiivisia tuloksia voi serologisissa ja ihopistokokeissa aiheuttaa myös epäpuhdas proteiininäyte, joka sisältää yhden tai useamman muun allergeenikontaminantin. On myös tärkeä huomioida kokeita suunniteltaessa sekä allergiatuloksia arvioitaessa ja vertailtaessa allergeeneihin, potilaisiin ja käytettyihin menetelmiin liittyvät ongelmakohdat. Erot käytettyjen proteiinipuhdistustekniikoiden välillä voivat vaikuttaa natiivin allergeenin puhtauteen ja aiheuttaa toisistaan poikkeavia tuloksia IgE-vasta-aineiden esiintyvyyksissä eri tutkimusten välillä. Tulosten ristiriitaisuuteen voivat vaikuttaa myös analyysissä käytetyt immunologiset menetelmät sekä valittu potilasjoukko, joka voi olla lähtöisin laajalta maantieteelliseltä alueelta, jossa ihmiset ovat voineet herkistyä eri lateksiproteiineille. Luonnonkumin proteiinit voivat käsittely- ja valmistusprosessin aikana myös eri tavalla modifioitua, aggregoitua tai fragmentoitua, ja tämä voi vaikuttaa edelleen lopputulokseen, jos tutkimuksissa käytetään hyvin erilaisia lähtömateriaaleja ja testivalmisteita.

## KIRJALLISUUS

- Aalberse, R. C. (1997). Food allergens. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 4(1), 55-60.
- Aalberse, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(2), 228-238.
- Aalberse, R. C. & van Ree, R. (1997). Crossreactive carbohydrate determinants. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 15(4), 375-387.
- Akasawa, A., Hsieh, L.-S., Martin, B. M., Liu, T. & Lin, Y. (1996). A Novel Acidic Allergen, Hev b 5, in Latex. Purification, cloning and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25389-25393.
- Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Mäkinen-Kiljunen, S., Yip, E. & Palosuo, T. (1995a). Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clinical & Experimental Allergy*, 25(7), 659-665.
- Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Turjanmaa, K., Reunala, T., Mäkinen-Kiljunen, S. & Palosuo, T. (1995b). Purification and Partial Amino Acid Sequencing of a 27-kD Natural Rubber Allergen Recognized by Latex-Allergic Children with Spina Bifida. *International Archives of Allergy and Immunology*, 106(3), 258-262.
- Alenius, H., Kalkkinen, N., Reunala, T., Turjanmaa, K. & Palosuo, T. (1996). The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its N-terminal 43-amino acid fragment, hevein. *The Journal of Immunology*, 156(4), 1618-1625.
- Alenius, H., Palosuo, T., Kelly, K., Kurup, V., Reunala, T., Mäkinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K. & Fink, J. (1993). IgE Reactivity to 14-kD and 27-kD Natural Rubber Proteins in Latex-Allergic Children with Spina bifida and Other Congenital Anomalies. *International Archives of Allergy and Immunology*, 102(1), 61-66.
- Alenius, H., Turjanmaa, K. & Palosuo, T. (2002). Natural rubber latex allergy. *Occupational and Environmental Medicine*, 59(6), 419-424.
- Antó, J. M., Pinart, M., Akdis, M., Auffray, C., Bachert, C., Basagaña, X., Carlsen, K.-H., Guerra, S., von Hertzen, L., Illi, S., Kauffmann, F., Keil, T., Kiley, J. P., Koppelman, G. H., Lupinek, C., Martinez, F. D., Nawijn, M. C., Postma, D. S., Siroux, V., ... Bousquet, J. (2012). Understanding the complexity of IgE-related phenotypes from childhood to young adulthood: A Mechanisms of the

- Development of Allergy (MeDALL) Seminar. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 943-954.e4.
- Aoki, Y., Takahashi, S., Takayama, D., Ogata, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., Asawatreratanakul, K., Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R., Shibata, D., Koyama, T. & Nakayama, T. (2014). Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. *Plant Science*, 225, 1-8.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S. & Falagiani, P. (2005). Detection of novel latex allergens associated with clinically relevant allergy to plant-derived foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(6), 1312-1314.
- Bach, J.-F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*, 347(12), 911-920.
- Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K. J., Fink, J. N., Sussman, G. L. & Kurup, V. P. (1997). IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *The Journal of Immunology*, 159(11), 5724-5732.
- Bannon, G. A. (2004). What makes a food protein an allergen? *Current Allergy and Asthma Reports*, 4(1), 43-46.
- Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., Bienvenu, F., Bienvenu, J. & Rougé, P. (2009). Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3 $\beta$ -glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Molecular Immunology*, 46(8-9), 1595-1604.
- Baur, X., Rennert, J. & Chen, Z. (1997). Latex allergen elimination in natural latex sap and latex gloves by treatment with alkaline potassium hydroxide solution. *Allergy*, 52(3), 306-311.
- Beezhold, D. H., Hickey, V. L., Kostyal, D. A., Puhl, H., Zuidmeer, L., van Ree, R. & Sussman, G. L. (2003). Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 90(4), 439-445.
- Beezhold, D. H., Hickey, V. L. & Sussman, G. L. (2001). Mutational analysis of the IgE epitopes in the latex allergen Hev b 5. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6), 1069-1076.
- Beezhold, D. H., Sussman, G. L., Kostyal, D. A. & Chang, N.-S. (1994). Identification of a 46-kD latex protein allergen in health care workers. *Clinical & Experimental Immunology*, 98(3), 408-413.

- Bernstein, D. I., Biagini, R. E., Karnani, R., Hamilton, R., Murphy, K., Bernstein, C., Arif, S. A. M., Berendts, B. & Yeang, H. Y. (2003). In vivo sensitization to purified *Hevea brasiliensis* proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(3), 610–616.
- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, 358(14), 1483–1494.
- Blanco, C., Carrillo, T., Castillo, R., Quiralte, J. & Cuevas, M. (1994). Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Annals of Allergy*, 73(4), 309–314.
- Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Sánchez-Monge, R., Aragoncillo, C., Castillo, R., Ortega, N., Alvarez, M., Carrillo, T. & Salcedo, G. (1999). Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), 507–513.
- Boller, T. (1987). Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. Teoksessa Kosuge, T. & Nester, E. (toim.), *Plant Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives 2*, Macmillan, New York, 385–413.
- Breddehorst, R. & David, K. (2001). What establishes a protein as an allergen? *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 756(1–2), 33–40.
- Breiteneder, H. & Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1, Part 1), 27–36.
- Breiteneder, H. & Mills, E. N. C. (2005). Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 14–23.
- Breiteneder, H. & Scheiner, O. (1998). Molecular and Immunological Characteristics of Latex Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 116(2), 83–92.
- Brown, R. H., Taenkhum, K., Buckley, T. J. & Hamilton, R. G. (2004). Different latex aeroallergen size distributions between powdered surgical and examination gloves: Significance for environmental avoidance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(2), 358–363.
- Bunyavanich, S., Shargorodsky, J. & Celedon, J. C. (2011). A meta-analysis of Th2 pathway genetic variants and risk for allergic rhinitis. *Pediatric Allergy and Immunology; Montpellier*, 22(4), 378–387.



- Burbank, A. J., Sood, A. K., Kesic, M. J., Peden, D. B. & Hernandez, M. L. (2017). Environmental determinants of allergy and asthma in early life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(1), 1–12.
- Ceuppens, J. L., Van Durme, P. & Doods-Goossens, A. (1992). Latex allergy in patient with allergy to fruit. *Lancet*, 339, 493.
- Charous, B. L., Tarlo, S. M., Charous, M. A. & Kelly, K. (2002). Natural rubber latex allergy in the occupational setting. *Methods*, 27(1), 15–21.
- Chen, Z., Posch, A., Cremer, R., Raulf-Heimsoth, M. & Baur, X. (1998). Identification of hevein (Hev b 6.02) in Hevea latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(3), 476–481.
- Churngchow, N., Suntaro, A. & Wittsuwannakul, R. (1995).  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes from the latex of Hevea brasiliensis. *Phytochemistry*, 39(3), 505–509.
- Chye, M. L., & Cheung, K. Y. (1995).  $\beta$ -1,3-Glucanase is highly-expressed in laticifers of Hevea brasiliensis. *Plant Molecular Biology*, 29(2), 397–402.
- Conrad, M. L., Ferstl, R., Teich, R., Brand, S., Blümer, N., Yildirim, A. Ö., Patrascan, C. C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., Wagner, H., Holst, O., von Mutius, E., Pfefferle, P. I., Kirschning, C. J., Garn, H. & Renz, H. (2009). Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 2869–2877.
- Coombs, R. R. A. & Gell, P. G. H. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. Teoksessa Gell, P. G. H. & Coombs, R. R. A. (toim.) *Clinical aspects of immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 317–337.
- Cornish, K. (1993). The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in cis-1,4-polyisoprene biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 218(1), 267–271.
- Cornish, K. (2001). Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry*, 57(7), 1123–1134.
- Cornish, K., Myers, M. D. & Kelley, S. S. (2004). Latex quantification in homogenate and purified latex samples from various plant species using near infrared reflectance spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 19(3), 283–296.
- Czuppon, A. B., Chen, Z., Rennert, S., Engelke, T., Meyer, H. E., Heber, M. & Baur, X. (1993). The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is

- the major allergen in latex. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92(5), 690–697.
- d'Auzac, J. & Jacob J. L. (1989). Teoksessa d'Auzac, J., Jacob, J. L. & Chrestin, H. (toim.), *Physiology of Rubber Tree Latex: The Laticiferous Cell and Latex- A Model of Cytoplasm*, CRC Press, 59-96.
- Dave, N. D., Xiang, L., Rehm, K. E. & Marshall, G. D. (2011). Stress and Allergic Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 31(1), 55–68.
- Dennis, M. S. & Light, D. R. (1989). Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(31), 18608–18617.
- Díaz-Perales, A., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Varela, J., Carrillo, T. & Salcedo, G. (2003). Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(5), 1002–1007.
- Díaz-Perales, A., Sánchez-Monge, R., Blanco, C., Lombardero, M., Carillo, T. & Salcedo, G. (2002). What is the role of the hevein-like domain of fruit class I chitinases in their allergenic capacity? *Clinical & Experimental Allergy*, 32(3), 448–454.
- Ebo, D. G., Hagendorens, M. M., Knop, K. J. D., Verweij, M. M., Bridts, C. H., Clerck, L. S. D. & Stevens, W. J. (2010). Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(2), 348–358.
- Edman, P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 283-293.
- Ege, M. J., Herzum, I., Büchele, G., Krauss-Etschmann, S., Lauener, R. P., Roponen, M., Hyvärinen, A., Vuitton, D. A., Riedler, J., Brunekreef, B., Dalphin, J.-C., Braun-Fahrlander, C., Pekkanen, J., Renz, H. & von Mutius, E. (2008). Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(2), 407-412.e4.
- Fimean julkaisu: Käsinetutkimus 2005. Haettu 5.10.2020 osoitteesta [https://www.fimea.fi/documents/160140/753095/19919\\_julkaisut\\_laitteet\\_ja\\_tarvikkeet\\_Latex\\_2005\\_06-05-03.pdf.pdf](https://www.fimea.fi/documents/160140/753095/19919_julkaisut_laitteet_ja_tarvikkeet_Latex_2005_06-05-03.pdf.pdf)
- Fuchs, T., Spitzauer, S., Vente, C., Hevler, J., Kapiotis, S., Rumpold, H., Kraft, D. & Valenta, R. (1997). Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(3), 356–364.
- Fuentes-Silva, D., Mendoza-Hernández, G., Stojanoff, V., Palomares, L. A., Zenteno, E., Torres-Larios, A. & Rodríguez-Romero, A. (2007). Crystallization

and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(9), 787–791.

- Förström, L. (1980). Contact urticaria from latex surgical gloves. *Contact Dermatitis*, 6(1), 33–34.
- Galli, S. J. & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*; 18(5), 693–704.
- Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445–454.
- Ganglberger, E., Radauer, C., Wagner, S., O Riordain, G., Beezhold, D. H., Brehler, R., Niggemann, B., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E. & Breiteneder, H. (2001). Hev b 8, the Hevea brasiliensis Latex Profilin, Is a Cross-Reactive Allergen of Latex, Plant Foods and Pollen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 125(3), 216–227.
- Gathen, Y. von der, Sander, I., Flagge, A., Brüning, T. & Raulf-Heimsoth, M. (2017). Quantification of protein and latex allergen content of various natural rubber latex products. *Allergologie Select*, 1(2), 109–119.
- Gern, J. E. (2015). Promising candidates for allergy prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 23–28.
- Gould, H. J. & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews. Immunology*, 8(3), 205–217.
- Haahtela, T., Hannuksela, M., Mäkelä, M. & Terho, E. O. (toim.) (2007). *Allergia*. Duodecim.
- Haahtela, T., Holgate, S., Pawankar, R., Akdis, C. A., Benjaponpitak, S., Caraballo, L., Demain, J., Portnoy, J. & von Hertzen, L. (2013). The biodiversity hypothesis and allergic disease: World allergy organization position statement. *World Allergy Organization Journal*, 6, 3. doi:10.1186/1939-4551-6-3
- Haahtela, T., Valovirta, E., Kauppi, P., Tommila, E., Saarinen, K., von Hertzen, L., Mäkelä, M. J. & The Finnish Allergy Programme Group. (2012). The Finnish Allergy Programme 2008-2018 – Scientific rationale and practical implementation. *Asia Pacific Allergy*, 2(4), 275-279. doi:10.5415/apallergy.2012.2.4.275
- Hamann, C. P. (1993). Natural Rubber Latex Protein Sensitivity in Review. *Dermatitis*, 4(1), 4–21.

- Hamilton, R. G. (2002). Diagnosis of natural rubber latex allergy. *Methods*, 27(1), 22–31.
- Hamilton, R. G., Biagini, R. E. & Krieg, E. F. (1999). Diagnostic performance of Food and Drug Administration-cleared serologic assays for natural rubber latex-specific IgE antibody. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(5), 925–930.
- Hamilton, R. G., Peterson, E. L. & Ownby, D. R. (2002). Clinical and laboratory-based methods in the diagnosis of natural rubber latex allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(2, Supplement), S47–S56.
- Hanski, I., von Hertzen, L., Fyhrquist, N., Koskinen, K., Torppa, K., Laatikainen, T., Karisola, P., Auvinen, P., Paulin, L., Mäkelä, M. J., Vartiainen, E., Kosunen, T. U., Alenius, H. & Haahtela, T. (2012). Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8334–8339.
- Hayashi, Y. (2009). Production of natural rubber from Para rubber tree. *Plant Biotechnology*, 26(1), 67–70.
- Ho, M. H.-K., Wong, W. H.-S. & Chang, C. (2014). Clinical Spectrum of Food Allergies: A Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 46(3), 225–240.
- Hoffmann-Sommergruber, K. (2000). Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 122(3), 155–166.
- Hong, T.-Y. & Meng, M. (2003). Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase of *Paenibacillus* sp. Isolated from garden soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 472–478.
- Jacob, J.-L., d’Auzac, J. & Prevôt, J.-C. (1993). The composition of natural latex from *Hevea brasiliensis*. *Clinical Reviews in Allergy*, 11(3), 325–337.
- Jekel, P. A., Hartmann, J. B. H. & Beintema, J. J. (1991). The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *European Journal of Biochemistry*, 200(1), 123–130.
- Kansanterveyslaitoksen julkaisu B5/2007: Sietokyky ja sen parantaminen allergiassa, Kansallisen allergiatyöryhmän raportti 2007. Haettu 25.9.2020 osoitteesta  
<https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/78281/2007b05.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Airenne, K. J., Laitinen, O. H., Repo, S., Pentikäinen, O. T., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M. S., Palosuo, T., Kulomaa, M. S. & Alenius, H. (2004). Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *Journal of Immunology*, 172(4), 2621–2628.
- King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A. E. & Thomas, W. (1995). Allergen nomenclature. *Allergy*, 50(9), 765–774.
- Koh, D., Ng, V., Leow, Y.-H. & Goh, C. L. (2005). A study of natural rubber latex allergens in gloves used by healthcare workers in Singapore. *British Journal of Dermatology*, 153(5), 954–959.
- Kurup, V. P., Alenius, H., Kelly, K. J., Castillo, L. & Fink, J. N. (1996). A two-dimensional electrophoretic analysis of latex peptides reacting with ige and igg antibodies from patients with latex allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 109(1), 58–67.
- Kurup, V. P. & Fink, J. N. (2001). The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy*, 56(1), 2–12.
- Kurup, V. P., Kelly, T., Elms, N., Kelly, K. & Fink, J. (1994). Cross-Reactivity of Food Allergens in Latex Allergy. *Allergy Proceedings; Providence*, 15(4), 211–216.
- Kurup, V. P., Sussman, G. L., Yeang, H. Y., Elms, N., Breiteneder, H., Arif, S. A., Kelly, K. J., Bansal, N. K. & Fink, J. N. (2005). Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. *Clinical and Molecular Allergy*, 3(1), 11. doi:10.1186/1476-7961-3-11
- Kurup, V. P., Yeang, H. Y., Sussman, G. L., Bansal, N. K., Beezhold, D. H., Kelly, K. J., Hoffman, D. R., Williams, B & Fink, J. N. (2000). Detection of immunoglobulin antibodies in the sera of patients using purified latex allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 30(3), 359–369.
- Laatikainen, T., Herten, L. von, Koskinen, J.-P., Mäkelä, M. J., Jousilahti, P., Kosunen, T. U., Vlasoff, T., Ahlström, M., Vartiainen, E. & Haahtela, T. (2011). Allergy gap between Finnish and Russian Karelia on increase. *Allergy*, 66(7), 886–892.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lavaud, F., Sabouraud, D., Deschamps, F. & Perdu, D. (1997). Crossreactions involving natural rubber latex. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 15(4), 429–447.

- Lee, H. I., Broekaert, W. F., Raikhel, N. V. & Lee, H. (1991). Co- and post-translational processing of the hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *The Journal of Biological Chemistry*, 266(24), 15944–15948.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E. & Reese, G. (1996). Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 553–564.
- Liss, G. M. & Sussman, G. L. (1999). Latex sensitization: Occupational versus general population prevalence rates. *American Journal of Industrial Medicine*, 35(2), 196–200.
- Litonjua, A. A., Carey, V. J., Burge, H. A., Weiss, S. T. & Gold, D. R. (1998). Parental History and the Risk for Childhood Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(1), 176–181.
- Mari, A., Scala, E., D'Ambrosio, C., Breiteneder, H. & Wagner, S. (2007). Latex Allergy within a Cohort of Not-at-Risk Subjects with Respiratory Symptoms: Prevalence of Latex Sensitization and Assessment of Diagnostic Tools. *International Archives of Allergy and Immunology*, 143(2), 135–143.
- Masilamani, M., Commins, S. & Shreffler, W. (2012). Determinants of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 32(1), 11–33.
- Matricardi, P. M., Franzinelli, F., Franco, A., Caprio, G., Murru, F., Cioffi, D., Ferrignoc, L., Palermoa, A., Ciccarelli, N. & Rosmini, F. (1998). Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(4), 439–444.
- Meade, B. J., Weissman, D. N. & Beezhold, D. H. (2002). Latex allergy: Past and present. *International Immunopharmacology*, 2(2), 225–238.
- Mengumpun, K., Tayapiwatana, C., Hamilton, R. G., Sangsupawanich, P. & Wititsuwannakul, R. (2008). Hydrophobic Allergens from the Bottom Fraction Membrane of *Hevea brasiliensis*. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 26(2–3), 129–136.
- Midoro-Horiuti, T., Brooks, E. G. & Goldblum, R. M. (2001). Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 87(4), 261–271.
- Mirzakhani, H., Carey, V. J., Zeiger, R., Bacharier, L. B., O'Connor, G. T., Schatz, M. X., Laranjo, N., Weiss, S. T. & Litonjua, A. A. (2019). Impact of parental asthma, prenatal maternal asthma control, and vitamin D status on risk of asthma and recurrent wheeze in 3-year-old children. *Clinical & Experimental Allergy*, 49(4), 419–429.

- Moir, G. F. J. (1959). Ultracentrifugation and Staining of Hevea Latex. *Nature*, 184(4699), 1626–1628.
- Moir, G. F. J. & Tata, S. J. (1960). The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. The soluble proteins of the bottom fractions. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, 16, 155-165.
- Mooibroek, H. & Cornish, K. (2000). Alternative sources of natural rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4), 355–365.
- Moore, M. M., Rifas-Shiman, S. L., Rich-Edwards, J. W., Kleinman, K. P., Camargo, C. A., Gold, D. R., Weiss, S. T. & Gillman, M. W. (2004). Perinatal Predictors of Atopic Dermatitis Occurring in the First Six Months of Life. *Pediatrics*, 113(3 Pt 1), 468–474.
- M'Raihi, M. L., Charpin, D., Pons, A., Bongrand, P. & Vervloet, D. (1991) Cross-reactivity between latex and banana. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 87, 129–130.
- Nieto, A., Mazón, A., Boquete, M., Carballada, F., Asturias, J. A., Martínez, J. & Martínez, A. (2002). Assessment of profilin as an allergen for latex-sensitized patients. *Allergy*, 57(9), 776–784.
- Niggemann, B. & Breiteneder, H. (2000). Latex Allergy in Children. *International Archives of Allergy and Immunology*, 121(2), 98–107.
- Nutter, A. F. (1979). Contact urticaria to rubber. *British Journal of Dermatology*, 101(5), 597–598.
- Ober, C. & Yao, T.-C. (2011). The genetics of asthma and allergic disease: A 21st century perspective. *Immunological Reviews*, 242(1), 10–30.
- O’Riordain, G., Radauer, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Adhami, F., Peterbauer, C. K., Blanco, C., Godnic-Cvar, J., Scheiner, O., Ebner, C. & Breiteneder, H. (2002). Cloning and molecular characterization of the *Hevea brasiliensis* allergen Hev b 11, a class I chitinase. *Clinical & Experimental Allergy*, 32(3), 455–462.
- Palmer, C. N. A., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J. D., O’Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J. & Compton, J. G. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, 38(4), 441–446.
- Palosuo, T., Alenius, H. & Turjanmaa, K. (2002). Quantitation of latex allergens. *Methods*, 27(1), 52–58.

- Palosuo, T., Antoniadou, I., Gottrup, F. & Phillips, P. (2011). Latex Medical Gloves: Time for a Reappraisal. *International Archives of Allergy and Immunology; Basel*, 156(3), 234–246.
- Palosuo, T., Kalkkinen, N., Alenius, H., Hamilton, R. G. & Blanco, C. (2008). Response. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(4), 696–698.
- Palosuo, T., Lehto, M., Kotovuori, A., Kalkkinen, N., Alenius, H., Reunala, T. & Turjanmaa, K. (2004). Prevalence of IgE antibodies to extensively purified Hev b13 and Hev b2 in natural rubber latex (NRL) allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2, Supplement), S77.
- Palosuo, T., Lehto, M., Kotovuori, A., Kalkkinen, N., Blanco, C., Poza, P., Carrillo, T., Hamilton, R. G., Alenius, H., Reunala, T. & Turjanmaa, K. (2007a). Latex allergy: Low prevalence of immunoglobulin E to highly purified proteins Hev b 2 and Hev b 13. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(10), 1502–1511.
- Palosuo, T., Reinikka-Railo, H., Kautiainen, H., Alenius, H., Kalkkinen, N., Kulomaa, M., Reunala, T. & Turjanmaa, K. (2007b). Latex allergy: The sum quantity of four major allergens shows the allergenic potential of medical gloves. *Allergy*, 62(7), 781–786.
- Pan, Z. (1995). The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450: Characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *The Journal of Biological Chemistry*, 15, 8487–8494.
- Peberdy, J. F. (1990). Fungal cell walls – a review. Teoksessa Kuhn, O. J., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W. & Copping, L. G. (toim.), *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*, Springer, 5-30.
- Pekar, J., Ret, D. & Untersmayr, E. (2018). Stability of allergens. *Molecular immunology*, 100, 14–20.
- Perrella, F. W. & Gaspari, A. A. (2002). Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods*, 27(1), 77–86.
- Posch, A., Chen, Z., Wheeler, C., Dunn, M., Raulfheimsoth, M. & Baur, X. (1997). Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(3), 385–395.
- Potaczek, D. P., Harb, H., Michel, S., Alhamwe, B. A., Renz, H. & Tost, J. (2017). Epigenetics and allergy: From basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics*, 9(4), 539–571.



- Ranta, P. M. & Ownby, D. R. (2004). A Review of Natural-Rubber Latex Allergy in Health Care Workers. *Clinical Infectious Diseases*, 38(2), 252–256.
- Rappaport, S. M. & Smith, M. T. (2010). Environment and Disease Risks. *Science*, 330(6003), 460–461.
- Raulf, M. (2014). The Latex Story. Teoksessa Bergmann, K.-C. & Ring, J. (toim.), *History of Allergy*, Karger, 100, 248–255.
- Raulf, M. (2016). Allergen component analysis as a tool in the diagnosis of occupational allergy: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 16(2), 93–100.
- Raulf-Heimsoth, M., Rihs, H.-P., Rozynek, P., Cremer, R., Gaspar, Â., Pires, G., Yeang, H. Y., Arif, S. a. M., Hamilton, R. G., Sander, I., Lundberg, M. & Brüning, T. (2007). Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clinical & Experimental Allergy*, 37(11), 1657–1667.
- Reindl, J., Rihs, H. P., Scheurer, S., Wangorsch, A., Haustein, D. & Vieths, S. (2002). IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *International Archives of Allergy and Immunology*, 128(2), 105–114.
- Reunala, T., Alenius, H., Turjanmaa, K. & Palosuo, T. (2004). Latex allergy and skin. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4(5), 397–401.
- Reynolds, L. A. & Finlay, B. B. (2017). Early life factors that affect allergy development. *Nature Reviews. Immunology*, 17(8), 518–528.
- Rihs, H. P., Chen, Z., Rozynek, P. & Cremer, R. (2001). Allergenicity of rHev b 10 (manganese-superoxide dismutase). *Allergy*, 56(1), 85–86.
- Rihs, H. P., Chen, Z., Schumacher, S., Rozynek, P., Cremer, R., Lundberg, M., Raulf-Heimsoth, M., Petersen, A. & Baur, X. (2000). Recombinant Hev b 1: Large-scale production and immunological characterization. *Clinical & Experimental Allergy*, 30(9), 1285–1292.
- Rihs, H. P., Sander, I., Heimann, H., Meurer, U., Brüning, T. & Raulf, M. (2015). The new latex allergen Hev b 15: IgE-binding properties of a recombinant serine protease inhibitor. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 25(2), 160–162.
- Rindsjö, E. & Scheynius, A. (2010). Mechanisms of IgE-mediated allergy. *Experimental Cell Research*, 316(8), 1384–1389.

- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Fuentes-Silva, D., Palomares, L. A., Muñoz-Cruz, S., Yépez-Mulia, L. & Orozco-Martínez, S. (2014). Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2 (endo- $\beta$ -1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(2), 329–341.
- Rolland, J. M. & O’Hehir, R. E. (2008). Latex allergy: A model for therapy. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(6), 898–912.
- Roponen, M., Hyvärinen, A., Hirvonen, M.-R., Keski-Nisula, L. & Pekkanen, J. (2005). Change in IFN- $\gamma$ -producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5), 1048–1052.
- Rose, K. & Steinbüchel, A. (2005). Biodegradation of Natural Rubber and Related Compounds: Recent Insights into a Hardly Understood Catabolic Capability of Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2803–2812.
- Salcedo, G., Díaz-Perales, A. & Sánchez-Monge, R. (1999). Fruit allergy: plant defence proteins as novel potential panallergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 29(9), 1158–1160.
- Salcedo, G., Diaz-Perales, A. & Sanchez-Monge, R. (2001). The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 1(2), 177–183.
- Schmidt, M. H. H., Raulf-Heimsoth, M. & Posch, A. (2002). Evaluation of patatin as a major cross-reactive allergen in latex-induced potato allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 89(6), 613–618.
- Schuler, S., Ferrari, G., Schmid-Grendelmeier, P. & Harr, T. (2013). Microarray-based component-resolved diagnosis of latex allergy: Isolated IgE-mediated sensitization to latexprofilin Hev b8 may act as confounder. *Clinical and Translational Allergy*, 3(1), 11. doi:10.1186/2045-7022-3-11
- Seifert, U., Wagner, S., Bublin, M., Ebner, C., Hafner, C., Mari, A., Arija M Arif, S., Yeang, H. Y., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (2006). The Role of Glycosylation of nHev b 2, The  $\beta$ -1,3-Glucanase from *Hevea Brasiliensis* Latex, in IgE Recognition. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2, Supplement), S132.
- Seppälä, U., Palosuo, T., Kalkkinen, N., Ylitalo, L., Reunala, T. & Turjanmaa, K. (2000). IgE reactivity to patatin-like latex allergen, Hev b 7, and to patatin of potato tuber, Sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex. *Allergy*, 55(3), 266–273.

- Siler, D. J. & Cornish, K. (1994). Hypoallergenicity of guayule rubber particle proteins compared to Hevea latex proteins. *Industrial Crops and Products*, 2(4), 307–313.
- Siler, D. J., Cornish, K. & Hamilton, R. G. (1996). Absence of cross-reactivity of IgE antibodies from subjects allergic to Hevea brasiliensis latex with a new source of natural rubber latex from guayule (*Parthenium argentatum*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98(5, Part 1), 895–902.
- Slater, J. E., Vedvick, T., Arthur-Smith, A., Trybul, D. E. & Kekwick, R. G. (1996). Identification, cloning, and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *The Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25394–25399.
- Sommer, S., Wilkinson, S. M., Beck, M. H., English, J. S. C., Gawkrödger, D. J. & Green, C. (2002). Type IV hypersensitivity reactions to natural rubber latex: Results of a multicentre study. *British Journal of Dermatology*, 146(1), 114–117.
- Stanley, S. J. & Bannon, G. A. (1999). Biochemistry of food allergens. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 17(3), 279–291.
- Stern, G. (1927). Überempfindlichkeit Gegen Kautschuk als Ursache von Urticaria und Quinckeschem Ödem. *Klinische Wochenschrift*, 6(23), 1096–1097.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, 299(6710), 1259–1260.
- Strachan, D. P., Taylor, E. M. & Carpenter, R. G. (1996). Family structure, neonatal infection, and hay fever in adolescence. *Archives of Disease in Childhood*, 74(5), 422–426.
- Subroto, T., de Vries, H., Schuringa, J. J., Soedjanaatmadja, U. M. S., Hofsteenge, J., Jekel, P. A. & Beintema, J. J. (2001). Enzymic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (lutoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(12), 1047–1055.
- Subroto, T., van Koningsveld, G. A., Schreuder, H. A., Soedjanaatmadja, U. M. S. & Beintema, J. J. (1996) Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in the lutoid-body fraction of *Hevea* latex. *Phytochemistry*, 43(1), 29–37.
- Sunderasan, E., Hamzah, S., Hamid, S., Ward, M. A., Yeang, H. Y. & Cardoso, M. J. (1995). Latex B-serum  $\beta$ -1, 3-glucanase (Hev b II) and a component of the microhelix (Hev b IV) are major latex allergens. *Journal of Natural Rubber Research*, 10(2), 82–99.
- Sussman, G. L., Beezhold, D. H. & Kurup, V. P. (2002). Allergens and natural rubber proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(2), S33–S39.

- Swanson, C. L., Buchanan, R. A. & Otey, F. H. (1979). Molecular weights of natural rubbers from selected temperate zone plants. *Journal of Applied Polymer Science*, 23(3), 743–748.
- Tata, S. J. (1980). Distribution of proteins between the fractions separated by ultracentrifugation. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, 28(2), 77–85.
- Theis, T. & Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences; Basel*, 61(4), 437–455.
- Tomazic-Jezic, V. J., Beezhold, D. H., Hashim, H., Palosuo, T., Raulf-Heimsoth, M., Swanson, M. & Hamilton, R. G. (2004). Performance of methods for the measurement of natural rubber latex (NRL) proteins, antigens and allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2, Supplement), S78.
- Tomazic, V. J., Withrow, T. J., Fisher, B. R. & Dillard, S. F. (1992). Latex-associated allergies and anaphylactic reactions. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 64(2), 89–97.
- Toraason, M. (2000). Latex Allergy in the Workplace. *Toxicological Sciences*, 58(1), 5–14.
- Turjanmaa, K. (2001). Diagnosis of latex allergy. *Allergy*, 56(9), 810–812.
- Turjanmaa, K. & Mäkinen-Kiljunen, S. (2002). Latex allergy: Prevalence, risk factors, and cross-reactivity. *Methods*, 27(1), 10–14.
- Turjanmaa, K., Alenius, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Reunala, T. & Palosuo, T. (1996). Natural rubber latex allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 51(9), 593–602.
- Turjanmaa, K., Reunala, T., Alenius, H., Brummer-Korvenkontio, H. & Palosuo, T. (1990). Allergens in latex surgical gloves and glove powder. *The Lancet*, 336(8730), 1588.
- Turjanmaa, K., Reunala, T., Tuimala, R. & Karkkainen T. (1984) Severe IgE mediated allergy to surgical gloves [abstract]. *Allergy*, 39, S-2
- Valenta, R. (2002). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Reviews: Immunology*, 2(6), 446–453.
- Vandenplas, O. & Raulf, M. (2017). Occupational Latex Allergy: The Current State of Affairs. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(3), 14. doi:10.1007/s11882-017-0682-5

- van Kampen, V., Blay, F. de, Folletti, I., Kobierski, P., Moscato, G., Olivieri, M., Quirce, S., Sastre, J., Walusiak-Skorupa, J., Kotschy-Lang, N., Müsken, H., Mahler, V., Schliemann, S., Ochmann, U., Sültz, J., Worm, M., Sander, I., Zahradnik, E., Brüning, T., ... Raulf-Heimsoth, M. (2013). Evaluation of commercial skin prick test solutions for selected occupational allergens. *Allergy*, 68(5), 651–658.
- von Hertzen, L., Hanski, I. & Haahtela, T. (2011). Natural immunity. *EMBO reports*, 12(11), 1089–1093.
- Wagner, S. & Breiteneder, H. (2002). The latex-fruit syndrome. *Plant Food Allergens*, 30(6), 935-940.
- Wagner, S. & Breiteneder, H. (2005). Hevea brasiliensis Latex Allergens: Current Panel and Clinical Relevance. *International Archives of Allergy and Immunology*, 136(1), 90–97.
- Wagner, S., Breiteneder, H., Simon-Nobbe, B., Susani, M., Krebitz, M., Niggemann, B., Brehler, R., Scheiner, O. & Hoffmann-Sommergruber, K. (2000). Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from hevea latex and molds. Purification, characterization, cloning and expression. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 7006–7014.
- Wagner, S., Radauer, C., Hafner, C., Fuchs, H., Jensen-Jarolim, E., Wüthrich, B., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (2004). Characterization of cross-reactive bell pepper allergens involved in the latex-fruit syndrome. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(11), 1739–1746.
- Warshaw, E. M. (1998). Latex allergy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 39(1), 1-24.
- Wessels, J. G. H. & Sietsma, J. H. (1981). Fungal cell walls: a survey. Teoksessa Tanner, W. & Loewus, F. A. (toim.), *Plant Carbohydrates II, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Volume 13B*, Springer, 352-394.
- Willett, W. C. (2002). Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*, 296(5568), 695–698.
- Yagami, T. (2002a). Features and Mode of Action of Cross-reactive Plant Allergens Relevant to Latex-fruit Syndrome. *Food and Agricultural Immunology*, 14(4), 241–253.
- Yagami, T. (2002b). Allergies to Cross-Reactive Plant Proteins: Latex-Fruit Syndrome Is Comparable with Pollen-Food Allergy Syndrome. *International Archives of Allergy and Immunology*, 128(4), 271–279.

- Yagami, T., Osuna, H., Kouno, M., Haishima, Y., Nakamura, A. & Ikezawa, Z. (2002). Significance of Carbohydrate Epitopes in a Latex Allergen with  $\beta$ -1,3-Glucanase Activity. *International Archives of Allergy and Immunology*, 129(1), 27-37.
- Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A., Komiyama, T., Kitagawa, K., Akasawa, A. & Ikezawa, Z. (1998). Plant defense-related enzymes as latex antigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(3), 379-385.
- Yeang, H. Y. (2004). Natural rubber latex allergens: New developments. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 4(2), 99-104.
- Yeang, H.-Y. (2008). Assessing the prevalence of sensitization to specific latex allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(4), 694-696.
- Yeang, H. Y., Arif, S. A. M., Raulf-Heimsoth, M., Loke, Y.-H., Sander, I., Sulong, S. H., Lau, C.-H. & Hamilton, R. G. (2004). Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(3), 593-598.
- Yeang, H. Y., Arif, S. A. M., Yusof, F. & Sunderasan, E. (2002a). Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods*, 27(1), 32-45.
- Yeang, H. Y., Cheong, K. F., Sunderasan, E., Hamzah, S., Chew, N. P., Hamid, S., Hamilton, R. G. & Cardoso, M. J. (1996). The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98(3), 628-639.
- Yeang, H. Y., Chow, K. S., Yusof, F., Arif, S. A. M., Chew, N. P. & Loke, Y. H. (2000). Appraisal of latex glove proteins in the induction of sensitivity to multiple latex allergens. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 10(4), 215-222.
- Yeang, H. Y., Hamilton, R. G., Bernstein, D. I., Arif, S. a. M., Chow, K.-S., Loke, Y.-H., Raulf-Heimsoth, M., Wagner, S., Breiteneder, H. & Biagini, R. E. (2006). Allergen concentration in natural rubber latex. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(8), 1078-1086.
- Yeang, H. Y., Lau, C. H., Arif, S. A. M., Loke, Y. H., Chan, J. L., Hamzah, S. & Hamilton, R. G. (2002b). Hev b 1, Hev b 2 and Hev b 3 contents in natural rubber latex and powdered latex gloves. *Journal of Rubber Research*, 5(3), 167-178.
- Yeang, H. Y., Ward, M. A., Zamri, A. S. M., Dennis, M. S. & Light, D. R. (1998). Amino acid sequence similarity of Hev b 3 to two previously reported 27-

- and 23-kDa latex proteins allergenic to spina bifida patients. *Allergy*, 53(5), 513–517.
- Yip, E. & Cacioli, P. (2002). The manufacture of gloves from natural rubber latex. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(2, Supplement), S3–S14.
- Yip, L., Hickey, V., Wagner, B., Liss, G., Slater, J., Breiteneder, H., Sussman, G. & Beezhold, D. (2000). Skin Prick Test Reactivity to Recombinant Latex Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 121(4), 292–299.
- Yip, E., Turjanmaa, K. & Mäkinen-Kiljunen, S. (1995). The "non-allergenicity" of NR dry rubber products, with reference to type 1 protein allergy. *Rubber Technology*, 48, 48-52.
- Yu-Fen, L., Langholz, B., Salam, M. T. & Gilliland, F. D. (2005). Maternal and Grandmaternal Smoking Patterns Are Associated With Early Childhood Asthma\*. *Chest; Chicago*, 127(4), 1232–1241.
- Zellweger, F. & Eggel, A. (2016). IgE-associated allergic disorders: Recent advances in etiology, diagnosis, and treatment. *Allergy*, 71(12), 1652–1661.

## LIITTEET

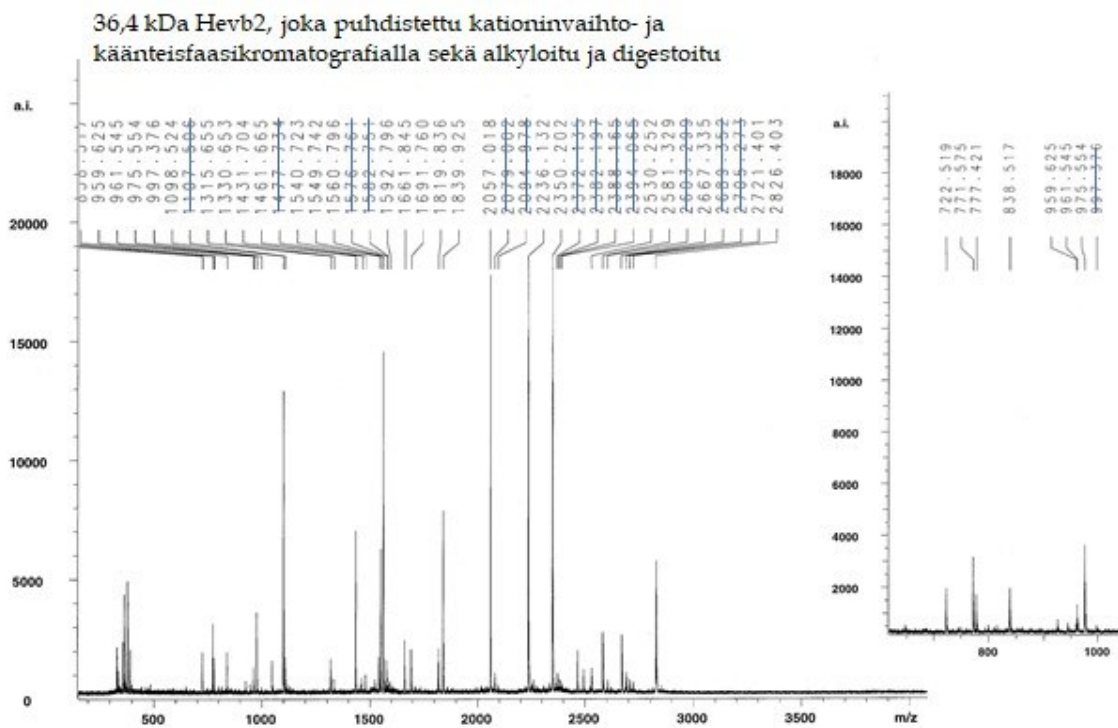
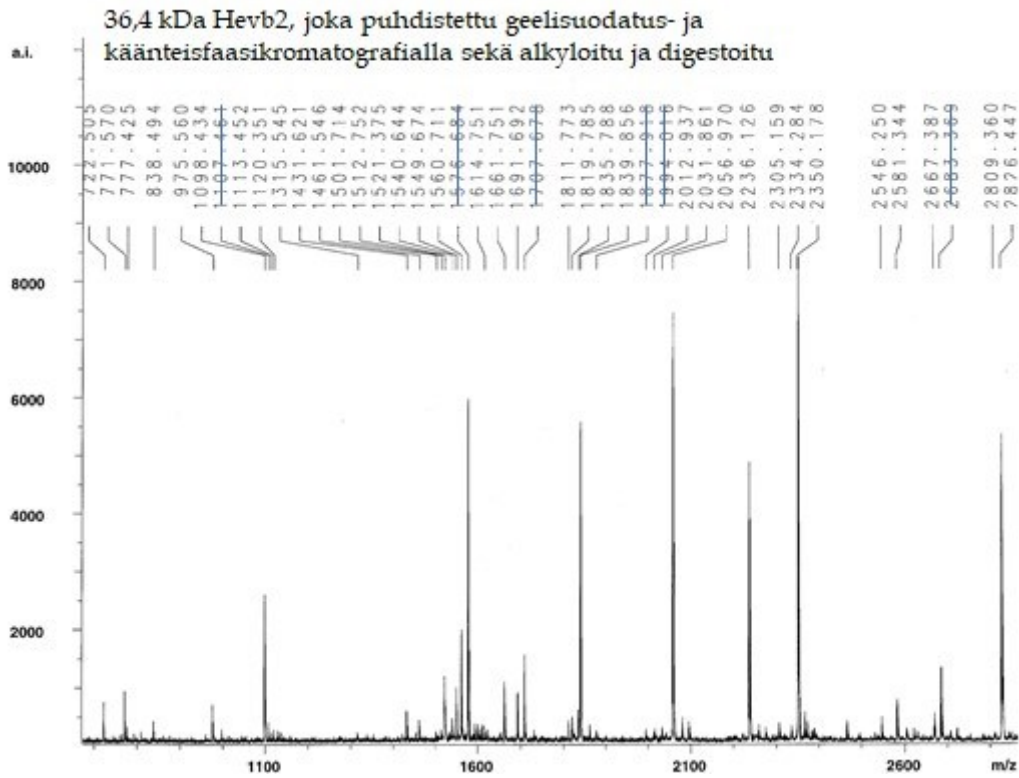
### Liite 1: Luonnonkumille allergisten potilaiden seeruminäytteet

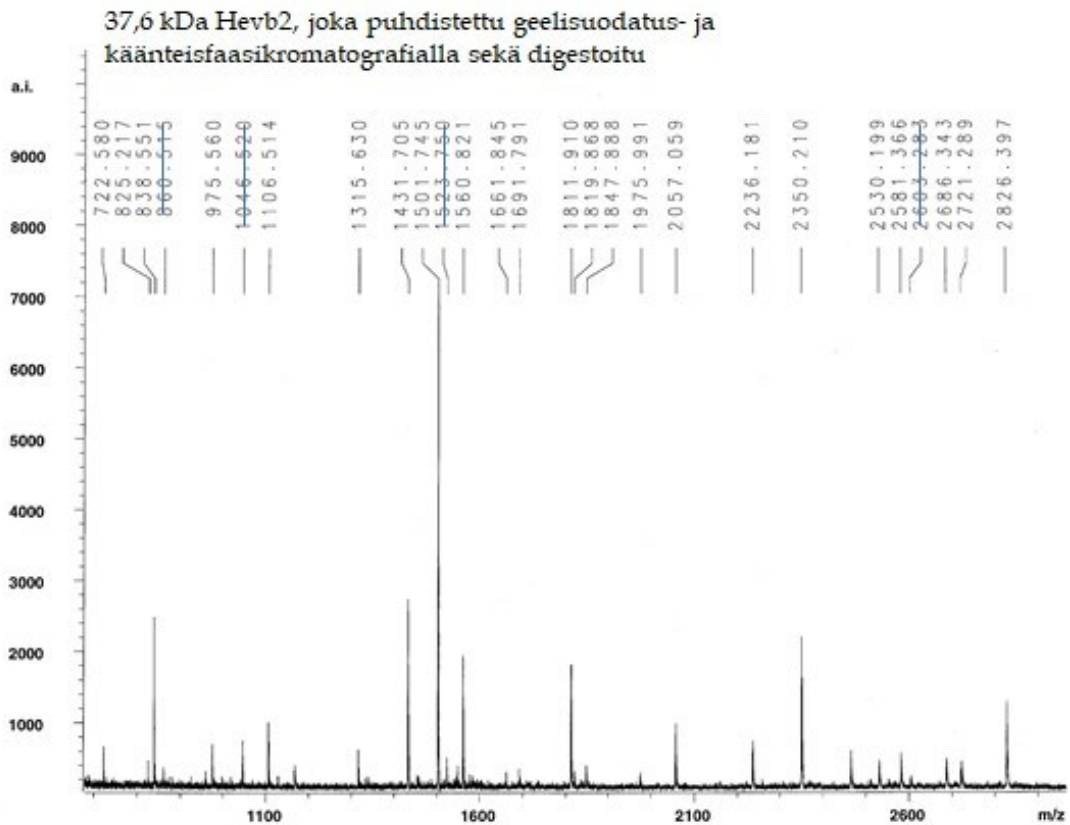
Immunologisissa analyyseissä käytetyt potilasseerumit, joissa on havaittu aiemmin spesifistä IgE-vasta-ainetta vähintään yhdelle luonnonkumin allergeeneista (Hevb1, 3, 5, 6, 7).

Potilas nro			Aikaisemmat mittaustulokset					
ELISA, 36,4 kDa	ELISA, 37,6 kDa	Western blot	raw+B	Hevb1	Hevb3	Hevb5	Hevb6	Hevb7
pos. kontrolli	pos. kontrolli	1	1,700	0,138	0,753	0,161	0,727	0,430
5	7		0,534	-0,002	0,008	0,001	0,128	0,172
6	3	2	1,726	0,011	0,048	0,009	2,502	0,441
21	5	4	0,766	0,051	0,253	0,016	0,679	0,153
4	6		0,512					
9	4	3	0,687			0,323	0,180	0,612
22	9						x	



## Liite 2: Trypsiinillä digestoidun Hevb2-proteiinin peptidien analysointi (MALDI-TOF MS)





Massaspektreistä on ylivivattu tärkeimmät massamodifikaatiot eli "väärät" massat (mm. Na +22, K +38, Met-oksidaatio +16/32) sekä tunnetut trypsiinistä ja/tai standardista aiheutuneet massapiikit, jotka voi jättää tietokantahaun ulkopuolelle.

### Liite 3: Hevb2-proteiinin tunnistus MALDI-TOF-peptidimassasormenjälkien avulla ProFound-tietokantahakuohjelmalla

Digestoitujen proteiinien MALDI-TOF-peptidimassasormenjälkiä verrattiin ProFound-tietokantahakuohjelmalla NCBI:n tietokannan laskennallisiin massoihin (18.3.2020). Haussa käytetyistä monoisotooppisista massoista ei tällöin poistettu kaikkia tunnettuja massamodifikaatioita ja trypsiinistä peräisin olevia massoja tai käytetty kaikkia massaspektrometrialla määritettyjä "oikeita" peptidimassoja (vrt. liite 2). Tietokantahaku yritettiin toistaa tarkastetuilla massoilla 1.-2.11.2020, mutta ProFound-ohjelma ei ollut tällöin verkossa käytettävissä (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>).

#### 36,4 kDa Hevb2 (geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografia)

##### Input Summary

**Search id** 54750EFE-4D18-5A7772FF  
**Sequences** 1156631  
**Date & Time** Wed Mar 18 22:42:54 2020 UTC (Search Time: 4.76 sec.)  
**Sample ID**  
**Database** NCBI [..\databases\nr]  
**Taxonomy** Viridiplantae (green plants)  
**Mass Range** 0 - 3000 kDa  
**pI Range** 0.0 -14.0  
**Digestion** Trypsin  
**Missed Cuts** 1  
**Modifications** +C7H7N@C(Complete);  
**Charge State** MH+  
**Masses (avg)**  
**Tolerance (avg)** 1.00 Da  
**Masses (mon)** 722.505 771.570 777.425 838.494 975.560 1098.434 1113.452  
1120.351 1315.545 1431.621 1461.546 1501.714 1512.752  
1521.375 1540.644 1549.674 1560.711 1576.684 1614.751  
1661.751 1691.692 1811.773 1819.785 1835.788 1839.856  
1877.918 2012.937 2031.861 2056.970 2236.126 2305.159  
2334.284 2350.178 2546.250 2581.344 2667.387 2683.369  
2809.360 2826.447  
**Tolerance** 0.10 Da  
**(mon)**  
**Number of 39**  
**Peptides**

##### Protein Candidates

Rank	Expectation	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	R
+1	1.4 × 10 <sup>-4</sup>	gi 4469175 emb CAB38443.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	39	9.5	38.98	●
-		gi 10946499 gb AAG24921.1 AF311749_1 beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	43	9.5	35.35	●
-		gi 268037674 gb ACY91851.1  beta-1,3-glucanase form RRII Gln 2 [Hevea brasiliensis]	32	9.5	41.72	●
-		gi 260099871 pdb 3EM5 A Chain A, Crystal Structure Of A Native Endo Beta-1,3-Glucanase (Hev B 2), A Major Allergen From Hevea Brasiliensis	38	9.6	35.26	●
-		gi 124365253 gb ABN09655.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	32	9.4	41.60	●

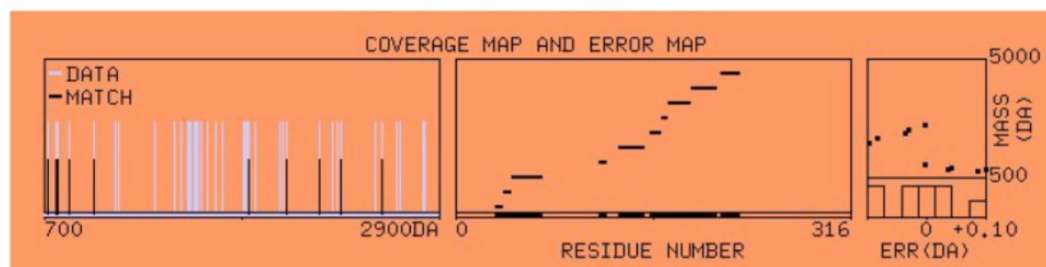
## ProFound - Search Result Details

The Rockefeller University Edition

Details for rank 1 candidate in search 54750EFE-4D18-5A7772FF

[1\\_gi|10946499|gb|AAG24921.1](#) AF311749\_1 beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]

Sample ID : [Pass:0]  
 Measured peptides : 39  
 Matched peptides : 10  
 Min. sequence coverage: 43%



Note: click on the  symbol to change column format.

Measured Mass (M)	Avg/ Mono	Computed Mass	Error (Da)	<input type="checkbox"/> Residues Start	<input type="checkbox"/> Residues To	Missed Cut	Peptide sequence
721.497	M	721.412	0.085	165	170	0	FLSSIR
770.562	M	770.465	0.098	39	45	0	AVLEALR
776.417	M	776.381	0.036	33	38	0	IYDPNR
837.486	M	837.445	0.041	115	121	0	NIHDAIR
974.552	M	974.555	-0.002	157	164	0	SYLNPIIR
1838.848	M	1838.941	-0.093	213	228	0	NLFDATLDVLYSALER
2055.962	M	2056.041	-0.079	171	188	0	SPLLANIYPYFTYAGNPR
2235.118	M	2235.153	-0.034	131	152	0	VSTAILTLVGNSYPPSAGAFR
2349.170	M	2349.199	-0.030	189	209	0	DISLPYALFTSPSVVWVDGQR
2580.336	M	2580.338	-0.002	46	70	0	GSNIELILGVFNSDLQSLTNPSSNAK

## Unmatched Monoisotopic Masses:

1098.434 1113.452 1120.351 1315.545 1431.621 1461.546 1501.714 1512.752 1521.375 1540.644 1549.674 1560.711 1576.684  
 1614.751 1661.751 1691.692 1811.773 1819.785 1835.788 1877.918 2012.937 2031.861 2305.159 2334.284 2546.250 2667.387  
 2683.369 2809.360 2826.447

## 36,4 kDa Hevb2 (kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografia)

## Input Summary

**Search Id** 4268FDC9-5F24-486B60F3  
**Sequences** 1156631  
**Date & Time** Wed Mar 18 22:39:19 2020 UTC (Search Time: 4.77 sec.)  
**Sample ID**  
**Database** NCBIInr [..\databases\inr]  
**Taxonomy** Viridiplantae (green plants)  
**Mass Range** 0 - 3000 kDa  
**pI Range** 0.0 -14.0  
**Digestion** Trypsin  
**Missed Cuts** 1  
**Modifications** +C7H7N@C(Complete);  
**Charge State** MH+  
**Masses (avg)**  
**Tolerance (avg)** 1.00 Da  
**Masses (mon)** 959.625 961.545 975.554 997.376 1098.524 1107.506 1315.655  
1330.653 1431.704 1461.665 1477.734 1540.723 1549.742  
1560.796 1576.761 1582.751 1592.796 1661.845 1691.760  
1819.836 1839.925 2057.018 2079.002 2094.978 2236.132  
2350.202 2372.135 2382.197 2388.165 2394.065 2530.252  
2581.329 2603.299 2667.335 2689.352 2705.273 2721.401  
2826.403  
**Tolerance** 0.10 Da  
**(mon)**  
**Number of**  
**Peptides** 38

## Protein Candidates

Rank	Expectation	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	R
+1	6.8×10 <sup>-8</sup>	gi 4469175 emb CAB38443.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	62	9.5	38.98	●
-		gi 10946499 gb AAG24921.1 AF311749_1 beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	69	9.5	35.35	●
-		gi 260099871 pdb 3EM5 A Chain A, Crystal Structure Of A Native Endo Beta-1,3-Glucanase (Hev B 2), A Major Allergen From Hevea Brasiliensis	57	9.6	35.26	●
-		gi 268037674 gb ACY91851.1  beta-1,3-glucanase form RRII Gln 2 [Hevea brasiliensis]	48	9.5	41.72	●
-		gi 124365253 gb ABN09655.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	48	9.4	41.60	●
-		gi 1184668 gb AAA87456.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	46	9.0	41.39	●



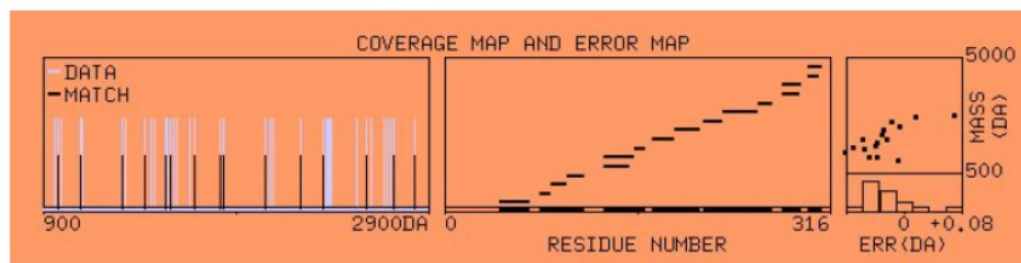
## ProFound - Search Result Details

The Rockefeller University Edition

Details for rank 1 candidate in search 4268FDC9-5F24-486B60F3

[1\\_gi|10946499|gb|AAG24921.1](#) AF311749\_1 beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]

Sample ID : [Pass:0]  
 Measured peptides : 38  
 Matched peptides : 15  
 Min. sequence coverage: 69%



Note: click on the  symbol to change column format.

Measured Mass (M)	Avg/Mono	Computed Mass	Error (Da)	<input type="checkbox"/> Residues	Missed	Peptide sequence	
				Start	To	Cut	
974.546	M	974.555	-0.008	157	164	0	SYLNPIIR
1097.516	M	1097.565	-0.049	79	87	0	GFWSSVLFK
1097.516	M	1097.554	-0.038	299	307	0	QFGLFFPDK
1314.647	M	1314.729	-0.082	258	268	0	TYLSNLIQHVK
1430.696	M	1430.751	-0.055	88	100	0	YIAVGNEISPVNR
1539.715	M	1539.787	-0.072	299	310	1	QFGLFFPDKWQK
1559.788	M	1559.828	-0.039	101	114	0	GTAWLAQFVLPAMR
1690.752	M	1690.790	-0.038	278	291	0	AIETYLAFAMFDENK
1818.828	M	1818.885	-0.057	278	292	1	AIETYLAFAMFDENK
1838.917	M	1838.941	-0.024	213	228	0	NLFDATLDVLYSALER
2056.010	M	2056.041	-0.031	171	188	0	SPLLANIYPYFTYAGNPR
2235.124	M	2235.153	-0.029	131	152	0	VSTAIIDLTLVGNSTYPPSAGAFK
2349.194	M	2349.199	-0.005	189	209	0	DISLPYALFTSPSVVVDGQR
2580.321	M	2580.338	-0.017	46	70	0	GSNIELILGVFNSDLQSLTNPSTNAK
2720.393	M	2720.376	0.017	131	156	1	VSTAIIDLTLVGNSTYPPSAGAFKRDVNR
2825.395	M	2825.324	0.071	229	257	0	ASGGSLVGVVSESGWPSAGAFATFDNGR

## Unmatched Monoisotopic Masses:

959.625 961.545 997.376 1107.506 1330.653 1461.665 1477.734 1549.742 1576.761 1582.751 1592.796 1661.845 2079.002  
 2094.978 2372.135 2382.197 2388.165 2394.065 2530.252 2603.299 2667.335 2689.352 2705.273

## 37,6 kDa Hevb2 (geelisuodatus- ja käänteisfaasikromatografia)

**Input Summary**

**Search id** 41D8FBC7-5FB4-47DB6063  
**Sequences** 1156631  
**Date & Time** Wed Mar 18 22:45:29 2020 UTC (Search Time: 4.77 sec.)  
**Sample ID**  
**Database** NCBI nr [..\databases\nr]  
**Taxonomy** Viridiplantae (green plants)  
**Mass Range** 0 - 3000 kDa  
**pI Range** 0.0 -14.0  
**Digestion** Trypsin  
**Missed Cuts** 1  
**Modifications** None  
**Charge State** MH+  
**Masses (avg)**  
**Tolerance (avg)** 1.00 Da  
**Masses (mon)** 722.580 838.551 860.515 975.560 1106.514 1315.630 1431.705  
 1501.745 1523.750 1560.821 1661.845 1691.791 1811.910  
 1819.868 1847.888 1975.991 2057.059 2236.181 2350.210  
 2530.199 2581.366 2603.283 2686.343 2826.397  
**Tolerance** 0.10 Da  
**(mon)**  
**Number of**  
**Peptides** 24

**Protein Candidates**

Rank	Expectation	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	R
+1	$1.2 \times 10^{-9}$	gi 268037674 gb ACY91851.1  beta-1,3-glucanase form RR11 Gln 2 [Hevea brasiliensis]	56	9.5	41.51	●
-		gi 124365253 gb ABN09655.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	56	9.4	41.49	●
-		gi 260099871 pdb 3EMS A Chain A, Crystal Structure Of A Native Endo Beta-1,3-Glucanase (Hev B 2), A Major Allergen From Hevea Brasiliensis	67	9.6	35.15	●
-		gi 124294785 gb ABN03966.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	51	9.5	41.59	●
-		gi 4469175 emb CAB38443.1  beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	49	9.5	38.88	●
-		gi 10946499 gb AAG24921.1 AF311749_1 beta-1,3-glucanase [Hevea brasiliensis]	54	9.5	35.24	●

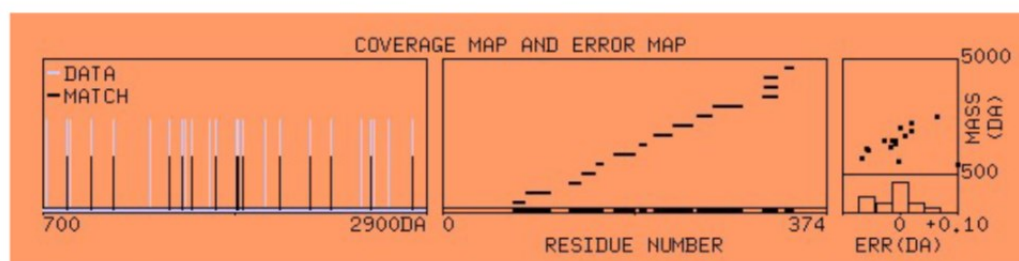
**ProFound - Search Result Details**

The Rockefeller University Edition

Details for rank 1 candidate in search 41D8FBC7-5FB4-47DB6063

[1.gi|268037674|gb|ACY91851.1](#) beta-1,3-glucanase form RR11 Gln 2 [Hevea brasiliensis]

Sample ID : [Pass:0]  
 Measured peptides : 24  
 Matched peptides : 15  
 Min. sequence coverage: 56%

Note: click on the  symbol to change column format.

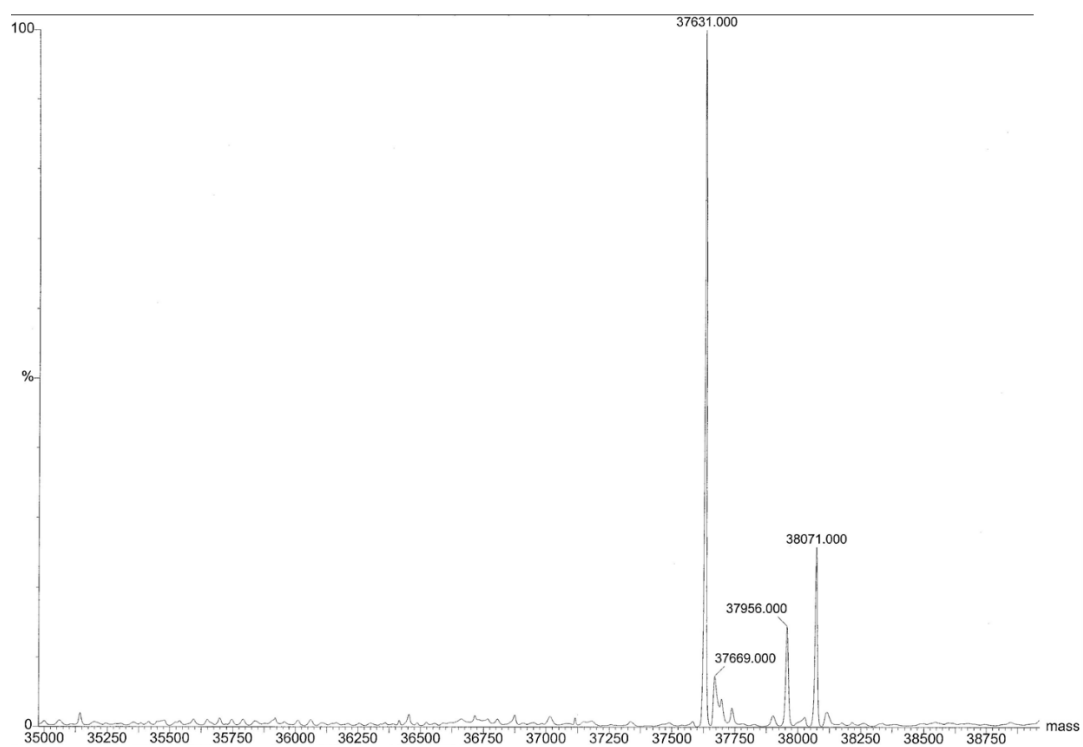
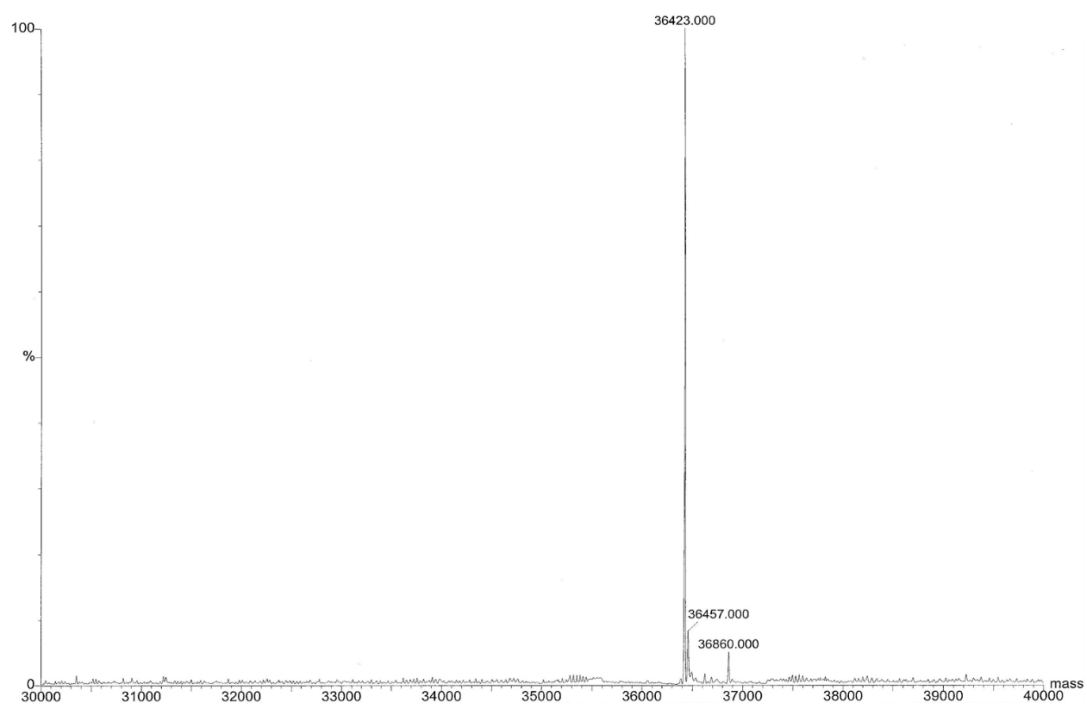
Measured Mass (M)	Avg/Mono	Computed Mass	Error (Da)	<input type="checkbox"/> Residues	Missed	Cut	Peptide sequence
837.543	M	837.445	0.098	151	157	0	NIHDAIR
974.552	M	974.555	-0.002	193	200	0	SYLNPIIR
1105.506	M	1105.570	-0.064	335	343	0	HFGLFFPNK
1430.697	M	1430.751	-0.054	124	136	0	YIAVGNEISPVNR
1500.737	M	1500.793	-0.056	69	81	0	IYDPNQAVLEALR
1559.813	M	1559.828	-0.014	137	150	0	GTAWLAQFVLPAMR
1690.783	M	1690.790	-0.007	314	327	0	AIETYLFAMFDENK
1810.902	M	1810.909	-0.007	249	264	0	NLFDATLDALYSALER
1818.860	M	1818.885	-0.025	314	328	1	AIETYLFAMFDENKK
1846.880	M	1846.892	-0.012	313	327	1	RAIETYLFAMFDENK
2056.051	M	2056.041	0.010	207	224	0	SPLLNIYPTYAGNPR
2235.173	M	2235.153	0.021	167	188	0	VSTAIIDLTLVGNSYPPSAGAFR
2349.202	M	2349.199	0.003	225	245	0	DISLPYALFTSPSVVWDGQR
2580.358	M	2580.338	0.020	82	106	0	GSNIELILGVPNSDLQSLTNPNAK
2825.389	M	2825.324	0.065	265	293	0	ASGGSLVVVSESGWPSAGAFATFDNGR

**Unmatched Monoisotopic Masses:**

722.580 860.515 1315.630 1523.750 1661.845 1975.991 2530.199 2603.283 2686.343



**Liite 4: Kationinvaihto- ja käänteisfaasikromatografialla puhdistetun Hevb2-proteiinin molekyylipainon määrittäminen (ESI MS)**





## Hevb2, josta poistettu signaalisekvenssi ja propeptidi (proteiinin massa -17, kun Q → pyroE)

[1-316] mass = 35088.9

Small polar:	D(15)	E(11)	N(22)	Q(10)				
Large polar:	K(13)	R(19)	H(3)					
Small non-polar:	S(28)	T(12)	A(26)	G(23)				
Large non-polar:	L(30)	I(18)	V(23)	M(4)	F(16)	Y(16)	W(5)	
Special:	C(1)	P(21)						

```

1  Q V G V C Y G M Q G N N L P P V S E V I A L Y K K S N I T R 30
31 M R I Y D P N R A V L E A L R G S N I E L I L G V P N S D L 60
61 Q S L T N P S N A K S W V Q K N V R G F W S S V L F R Y I A 90
91 V G N E I S P V N R G T A W L A Q F V L P A M R N I H D A I 120
121 R S A G L Q D Q I K V S T A I D L T L V G N S Y P P S A G A 150
151 F R D D V R S Y L D P I I G F L S S I R S P L L A N I Y P Y 180
181 F T Y A Y N P R D I S L P Y A L F T S P S V V V W D G Q R G 210
211 Y K N L F D A T L D A L Y S A L E R A S G G S L E V V V S E 240
241 S G W P S A G A F A A T F D N G R T Y L S N L I Q H V K G G 270
271 T P K R P N R A I E T Y L F A M F D E N K K Q P E V E K H F 300
301 G L F F P D K R P K Y N L N F G 316

```

## Hevb2, josta poistettu signaalisekvenssi

[1-338] mass = 37634.7

Small polar:	D(17)	E(13)	N(24)	Q(10)				
Large polar:	K(15)	R(19)	H(4)					
Small non-polar:	S(30)	T(14)	A(28)	G(23)				
Large non-polar:	L(32)	I(20)	V(23)	M(5)	F(17)	Y(16)	W(6)	
Special:	C(1)	P(21)						

```

1  Q V G V C Y G M Q G N N L P P V S E V I A L Y K K S N I T R 30
31 M R I Y D P N R A V L E A L R G S N I E L I L G V P N S D L 60
61 Q S L T N P S N A K S W V Q K N V R G F W S S V L F R Y I A 90
91 V G N E I S P V N R G T A W L A Q F V L P A M R N I H D A I 120
121 R S A G L Q D Q I K V S T A I D L T L V G N S Y P P S A G A 150
151 F R D D V R S Y L D P I I G F L S S I R S P L L A N I Y P Y 180
181 F T Y A Y N P R D I S L P Y A L F T S P S V V V W D G Q R G 210
211 Y K N L F D A T L D A L Y S A L E R A S G G S L E V V V S E 240
241 S G W P S A G A F A A T F D N G R T Y L S N L I Q H V K G G 270
271 T P K R P N R A I E T Y L F A M F D E N K K Q P E V E K H F 300
301 G L F F P D K R P K Y N L N F G A E K N W D I S T E H N A T 330
331 I L F L K S D M 338

```

## Liite 6: ELISA-analyysien mittaustulokset ja tulosten normalisointi

IgE-ELISA, raakadata 36,4 kDa							IgE-ELISA, normalisoitu data					
Potilas / kontrolli	A	B	C	D	ka.	SD	A	B	C	D	ka.	SD
Pos.	1,895	1,621	0,347	0,366	1,057	0,707	1,792	1,533	0,328	0,346	1,000	0,669
Neg.	-0,001	-0,002	-0,046	-0,048	-0,024	0,023	-0,001	-0,002	-0,044	-0,045	-0,023	0,022
3	-0,003	-0,002			-0,003	0,001	-0,003	-0,002			-0,002	0,000
4	0,186	0,131			0,159	0,028	0,176	0,124			0,150	0,026
5	0,185	0,198			0,192	0,007	0,175	0,187			0,181	0,006
6	1,222	1,105			1,164	0,059	1,156	1,045			1,100	0,055
7	0,066	0,071			0,069	0,003	0,062	0,067			0,065	0,002
8	0,004	0,002			0,003	0,001	0,004	0,002			0,003	0,001
9	1,064	1,068			1,066	0,002	1,006	1,010			1,008	0,002
10	0,141	0,116			0,129	0,013	0,133	0,110			0,122	0,012
11	0,013	0,011			0,012	0,001	0,012	0,010			0,011	0,001
12	0,019	0,020			0,020	0,001	0,018	0,019			0,018	0,000
13	0,007	0,009			0,008	0,001	0,007	0,009			0,008	0,001
14	0,044	0,033			0,039	0,006	0,042	0,031			0,036	0,005
15	0,079	0,073			0,076	0,003	0,075	0,069			0,072	0,003
16	0,021	0,017			0,019	0,002	0,020	0,016			0,018	0,002
17	0,072	0,077			0,075	0,003	0,068	0,073			0,070	0,002
18	0,015	0,012			0,014	0,002	0,014	0,011			0,013	0,001
19	0,008	0,009			0,009	0,001	0,008	0,009			0,008	0,000
20	0,061	0,053			0,057	0,004	0,058	0,050			0,054	0,004
21	1,150	1,089			1,120	0,031	1,088	1,039			1,059	0,029
22	0,084	0,040			0,062	0,022	0,079	0,038			0,059	0,021
23	0,000	-0,002			-0,001	0,001	0,000	-0,002			-0,001	0,001
24	0,021	0,007			0,014	0,007	0,020	0,007			0,013	0,007
25	-0,001	0,000			-0,001	0,001	-0,001	0,000			0,000	0,000
26	0,003	0,001			0,002	0,001	0,003	0,001			0,002	0,001
27	0,000	-0,001			-0,001	0,001	0,000	-0,001			0,000	0,000
28	-0,003	-0,001			-0,002	0,001	-0,003	-0,001			-0,002	0,001
29	0,012	0,014			0,013	0,001	0,011	0,013			0,012	0,001
30	0,022	0,018			0,020	0,002	0,021	0,017			0,019	0,002
31	0,007	0,004			0,006	0,002	0,007	0,004			0,005	0,001
32	-0,003	-0,004			-0,004	0,001	-0,003	-0,004			-0,003	0,000
33	-0,002	0,006			0,002	0,004	-0,002	0,006			0,002	0,004
34	0,006	0,000			0,003	0,003	0,006	0,000			0,003	0,003
35	0,005	0,003			0,004	0,001	0,005	0,003			0,004	0,001
36	0,000	0,000			0,000	0,000	0,000	0,000			0,000	0,000
37	0,030	0,021			0,026	0,005	0,028	0,020			0,024	0,004
38	0,064	0,052			0,058	0,006	0,061	0,049			0,055	0,006
39	0,010	0,009			0,010	0,001	0,009	0,009			0,009	0,000
40	0,014	0,013			0,014	0,001	0,013	0,012			0,013	0,000
41	-0,003	0,000			-0,002	0,002	-0,003	0,000			-0,001	0,001
42	0,020	0,017			0,019	0,002	0,019	0,016			0,017	0,001
43	0,004	0,000			0,002	0,002	0,004	0,000			0,002	0,002
44	-0,002	-0,001			-0,002	0,001	-0,002	-0,001			-0,001	0,000
45			-0,048	-0,045	-0,047	0,002	-0,045	-0,043			-0,044	0,001
46			-0,044	-0,023	-0,034	0,011	-0,042	-0,022			-0,032	0,010
47			0,003	0,007	0,005	0,002	0,003	0,007			0,005	0,002
48			-0,035	-0,037	-0,036	0,001	-0,033	-0,035			-0,034	0,001
49			-0,046	-0,045	-0,046	0,001	-0,044	-0,043			-0,043	0,000
50			-0,046	-0,047	-0,047	0,001	-0,044	-0,044			-0,044	0,000
51			-0,048	-0,048	-0,048	0,000	-0,045	-0,045			-0,045	0,000
52			-0,045	-0,047	-0,046	0,001	-0,043	-0,044			-0,044	0,001
53			-0,047	-0,032	-0,040	0,007	-0,044	-0,030			-0,037	0,007
54			-0,043	-0,047	-0,045	0,002	-0,041	-0,044			-0,043	0,002
55			-0,045	-0,045	-0,045	0,000	-0,043	-0,043			-0,043	0,000
56			-0,043	-0,044	-0,044	0,001	-0,041	-0,042			-0,041	0,000
57			-0,046	-0,045	-0,046	0,001	-0,044	-0,043			-0,043	0,000
58			0,048	-0,038	0,005	0,043	0,045	-0,036			0,005	0,041
59			-0,045	-0,046	-0,046	0,001	-0,043	-0,044			-0,043	0,000
60			0,014	0,196	0,105	0,091	0,013	0,185			0,099	0,086
61			-0,003	0,016	0,007	0,010	-0,003	0,015			0,006	0,009
62			-0,045	-0,048	-0,047	0,002	-0,043	-0,045			-0,044	0,001
63			-0,019	-0,020	-0,020	0,001	-0,018	-0,019			-0,018	0,000
64			-0,047	-0,045	-0,046	0,001	-0,044	-0,043			-0,044	0,001
65			-0,045	-0,039	-0,042	0,003	-0,043	-0,037			-0,040	0,003
66			0,144	-0,030	0,057	0,087	0,136	-0,028			0,054	0,082
67			-0,044	-0,047	-0,046	0,002	-0,042	-0,044			-0,043	0,001
68			-0,046	-0,045	-0,046	0,001	-0,044	-0,043			-0,043	0,000
69			-0,044	-0,034	-0,039	0,005	-0,042	-0,032			-0,037	0,005
70			0,066	-0,048	0,009	0,057	0,062	-0,045			0,009	0,054
71			-0,047	-0,045	-0,046	0,001	-0,044	-0,043			-0,044	0,001
72			-0,037	-0,044	-0,041	0,004	-0,035	-0,042			-0,038	0,003
73			-0,049	-0,048	-0,049	0,001	-0,046	-0,045			-0,046	0,000
Pos. aikuispooli			0,439	0,249	0,344	0,095	0,415	0,236			0,325	0,090
SB-pooli			0,374	0,325	0,350	0,025	0,354	0,307			0,331	0,023
Neg. aikuispooli			-0,048	-0,049	-0,049	0,001	-0,045	-0,046			-0,046	0,000
Pos. pooli (pos. kontrolli ja 6, 9, 21)			0,869	1,015	0,942	0,073	0,822	0,960			0,891	0,069

IgE-ELISA, raakadata 37,6 kDa					IgE-ELISA, normalisoitu data			
Potilas/kontrolli	A	B	ka.	SD	A	B	ka.	SD
Pos.	1,073	0,807	0,940	0,133	1,141	0,859	1,000	0,141
Neg.	-0,002	-0,002	-0,002	0,000	-0,002	-0,002	-0,002	0,000
3	0,700	0,775	0,738	0,038	0,745	0,824	0,785	0,040
4	0,996	0,538	0,767	0,229	1,060	0,572	0,816	0,244
5	0,090	0,188	0,139	0,049	0,096	0,200	0,148	0,052
6	0,052	0,037	0,045	0,007	0,055	0,039	0,047	0,008
7	0,115	0,126	0,121	0,006	0,122	0,134	0,128	0,006
8	0,109	0,061	0,085	0,024	0,116	0,065	0,090	0,026
9	0,020	0,018	0,019	0,001	0,021	0,019	0,020	0,001
10	-0,006	-0,005	-0,006	0,001	-0,006	-0,005	-0,006	0,001
Pos. pooli (pos. kontrolli ja 3-5)	0,455	0,488	0,472	0,017	0,484	0,519	0,502	0,018