

Marja Juustila & Susanna Ruokonen

**ANTIGEENISPESIFISTEN LYMFOSYYTTIEN  
PROLIFERAATIOTESTIN OPTIMOINTI**

**ANTIGEENISPESIFISTEN LYMFOSYYTTIEN  
PROLIFERAATIOTESTIN OPTIMOINTI**

Marja Juustila  
Susanna Ruokonen  
Opinnäytetyö  
Kevät 2013  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

# TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijät: Marja Juustila & Susanna Ruokonen

Opinnäytetyö nimi: Antigeenispesifisten lymfosyyttien proliferaatiotestin optimointi

Työn ohjaajat: Petri Kulmala, Minna Kihlström, Tiina Kirveskoski, Paula Reponen & Annikki Savolainen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2013

Sivumäärä: 39 + 11 liitettä

---

Ruoka-aineallergiat ovat alle kouluikäisten lasten yleisin allergia. Pienillä lapsilla ravitsemukselle tärkeistä ruoka-aineista johtuvaa allergiaa aiheuttavat usein maito sekä viljat.

Opinnäytetyömme toteutettiin osana Oulun yliopiston mikrobiologian ja immunologian yksikössä toimivan dosentti Petri Kulmalan työryhmän projektia, jossa selvitetään lymfosyyttien toimintaa ja ominaisuuksia terveillä ja ruoka-allergioista kärsivillä lapsilla.

Tehtävänäimme oli laboratorion keuin selvittää, mikä olisi eräiden vehnä- ja maitoproteiinien optimaalinen pitoisuus valkosolujen *in vitro*-proliferaatiotestissä. Kullakin tutkimukseen valitulla proteiinilla on osoitettu olevan keskeinen asema kyseisessä ruoka-aineallergiassa.

Tavoitteena oli tutkia proteiinikonsentraation vaikutusta solujen proliferaatioon, siten että löytäisimme alimman vasteen antavan proteiinikonsentraation. Vasteella tarkoitamme lymfosyyttien jakaantumista. Toinen opinnäytetyössä selvitettävä asia oli interleukiini-2-sytokiinin eli kasvutekijän lisäämisen vaikutus proliferaatioon.

Laboratorion keuin löysimme lähes kaikille antigeeneille optimaalisen konsentraation, ja interleukiini-2:n lisäämisellä oli todistetusti selkeä yhteys soluproliferaatiota lisäävästi.

---

Asiasanat: Allergia, proliferaatio, *in vitro*, lymfosyytti, interleukiini-2

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

---

Authors: Marja Juustila & Susanna Ruokonen

Title of thesis: Optimization of an Antigen Specific Lymphocyte Proliferation Test

Supervisors: Petri Kulmala, Minna Kihlström, Tiina Kirveskoski, Paula Reponen & Annikki Savolainen

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2013

Number of pages: 39 + 11 appendices

---

The basis of our study was the demand for optimization of an antigen specific lymphocyte proliferation test. This study was done under the supervision of University of Oulu Faculty of Medicine. It was part of a bigger research concerning lymphocyte features and interactions among healthy and food-allergic children.

The first aim of our thesis was to find the lowest amount of protein that causes a reaction i.e. lymphocyte proliferation in a *in vitro* experiment. The second aim was to study how interleukin-2 affects the proliferation.

This quantitative *in vitro* research was done through isolation of human lymphocytes, dyeing the cells and proliferating for six days. After proliferation cells were dyed and then measured with a flow cytometer.

Based on the results we found out the lowest amounts of each protein that will have an effect on a healthy person. It was also proven that interleukin-2 has an increasing effect on the proliferation.

---

Keywords: Allergy, proliferation, *in vitro*, lymphocyte, interleukin-2

# SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	6
2 ALLERGIA.....	8
2.1 Ruoka-aineallergia .....	9
2.1.1 Vehnäallergia ja siihen liittyvät proteiinit .....	9
2.1.2 Maitoallergia ja siihen liittyvät proteiinit .....	10
2.2 Siedätyshoito .....	11
3 ELIMISTÖN PUOLUSTUSJÄRJESTELMÄ .....	12
3.1 Lymfosyyttien synty.....	12
3.2 Interleukiini-2 (IL-2) .....	13
4 VIRTAUSSYTOTOMETRIA.....	14
6 TUTKIMUSTEHTÄVÄT .....	16
7 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN .....	17
7.1 Antigeenien valmistaminen.....	17
7.2 Tutkimusaineiston keruu .....	18
7.3 Perifeerisen veren solujen eristys .....	18
7.4 CFSE-värjäys .....	19
7.5 Antigeenien lisäys ja kasvatus.....	19
6.6 Proliferaation värjäys ja mittaus.....	21
7 TULOSTEN KÄSITTELY .....	22
8 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	26
9 POHDINTA .....	34
LÄHTEET.....	36
LIITTEET	

# 1 JOHDANTO

Ruoka-aineallergian esiintyvyyden arvioidaan vaihtelevan iän mukaan 5–10 %. (Kaila, Korppi, Mäkelä, Pelkonen & Valovirta, 2009, 18). Pienillä lapsilla ravitsemukselle tärkeistä ruoka-aineista johtuvaa allergiaa aiheuttavat yleisimmin maito sekä viljoista vehnä, ohra sekä ruis, mutta mikä tahansa ruoka-aine voi saada aikaan allergisen reaktion. Immunologisen puolustusreaktion, tarkoituksena on suojella elimistöä oletettuja haitallisia kohteita vastaan. Allerginen reaktio on epätarkoituksen mukainen immunologinen reaktio, jossa puolustuksen kohteena ovat elimistölle vaarattomat ympäristön antigeenit. Allergeeninä eli allergisen reaktion aiheuttavana antigeeninä ruoka-aineallergiassa toimivat usein ruoan erilaiset proteiinit tai muut pienimolekyyliset yhdisteet. (Ruoka-allergiat, 2012, hakupäivä 17.1.2012.)

Allergiassa elimistön puolustus- eli immuunijärjestelmä toimii vääristyneesti ulkoisia tekijöitä kohtaan. Tästä järjestelmästä vastaavat veren valkosolut reagoivat mm. suolisto- joutuneita ruoka-aineita vastaan ja alkavat erittää kemiallisia välittäjäaineita, kuten histamiinia. Tämä johtaa allergisen reaktion puhkeamiseen, joka ilmenee mm. ihottumana tai ripulina. (Jalanko, 2009, hakupäivä 26.10.2012.) Immunoglobuliini E (IgE) toimii suuressa osassa allergioita välittäjäaineena. Mikäli reaktio tapahtuu minuuttien tai tuntien kuluttua altistumisesta on kyseessä atooppinen allergia. Jos reaktio etenee hitaammin ja ilmaantuu päivien kuluessa, on kyseessä soluvälitteinen tai viivästynyt allergia. Jälkimmäisen näistä uskotaankin olevan merkittävä mekanismi juuri ruoka-aineallergioissa. (Ruoka-allergia (lapset), 2009, hakupäivä 25.10.2012.)

Maito ja viljat sisältävät useita valkuaisaineita ja ovat siksi paljon käytettyjä ravintoaineita, mutta ne aiheuttavat usein lapsilla myös ruoka-aineallergioita. (Jalanko, 2009, hakupäivä 26.10.2012). Pitkään ollaan oltu sitä mieltä, että ainoa käytäntö hoitaa ruoka-aineallergioita on ollut allergiaa aiheuttavan ruuan välttäminen. Tehtyjen tutkimusten avulla on kuitenkin pystytty parantamaan ruoka-aineallergiaa sairastavien lasten sietokykyä allergeeniä kohtaan siedätushoidoilla, joka toteutetaan suun kautta hitaasti suurennevin annoksin. (Mäkelä, Kulmala, Pelkonen, Remes & Kuitunen, 2011, hakupäivä 26.10.2012.)

Aiheen tähän opinnäytetyöhön saimme keväällä 2012 dosentti Petri Kulmalalta, jonka johtama tutkimusryhmä Oulun yliopiston diagnostiikan laitoksen mikrobiologian ja immunologian yksikössä tutkii immuunivasteen säätelyä sekä sietokyvyn kehittymistä ja induktioita terveillä ja ruoka-allergiaa sairastavilla lapsilla. Tutkimusryhmällä on meillä useita projekteja, joista osa toteutetaan kansallisena monikeskustutkimuksena.

Tämän kvantitatiivisen opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida laboratoriotestein mittaamenetelmä, jolla pyrittiin selvittämään alin vehnä- ja maitoproteiinien pitoisuus, jota voidaan käyttää antigeenispesifisten lymfosyyttien proliferaatiotesteissä. Työn aineistona käytettiin vapaaehtoisena tutkimukseen osallistuneiden henkilöiden verinäytteitä, joista eristettiin perifeerisen veren mononukleaarisia valkosoluja, lymfosyyttejä, tutkimusta varten. Solujen proliferaatiota testattiin vielä käyttäen lisänä interleukiini-2-kasvutekijää, joka vaikuttaa solujakautumista tehostaen. Tutkimustehtävänäme oli löytää pienimmät vasteen antavat proteiinkonsentraatiot tutkittavista antigeeneistä ja selvittää minkälainen vaikutus interleukiini-2:lla on proliferaatioon. Näitä tietoja tutkimusryhmä voi hyödyntää omissa mittauksissaan ja tutkimustyössään.

## 2 ALLERGIA

Allergia tarkoittaa immuunijärjestelmän haitallisia reaktioita yleisesti esiintyviä ja vaarattomia aineita kohtaan. (Hedman, Heikkinen, Huovinen, Järvinen, Meri & Vaara 2011, 296). Reaktiossa valkosolut tuottavat välittäjä- ja vasta-aineita väärää kohdetta, esim. ruoka-ainetta vastaan, vaikka kohteena tulisi olla elimistölle haitalliset mikrobit kuten bakteerit ja virukset. (Haahtela, Hannuksela, Mäkelä & Terho, 2007,8,31). Ympäristötekijät ja henkilön taipumus muodostaa IgE-vasta-aineita vaikuttavat allergian syntymiseen, jossa on erotettavissa kaksi päävaihetta, herkistyminen ja oireilu. (Töyry, 2007, 8).

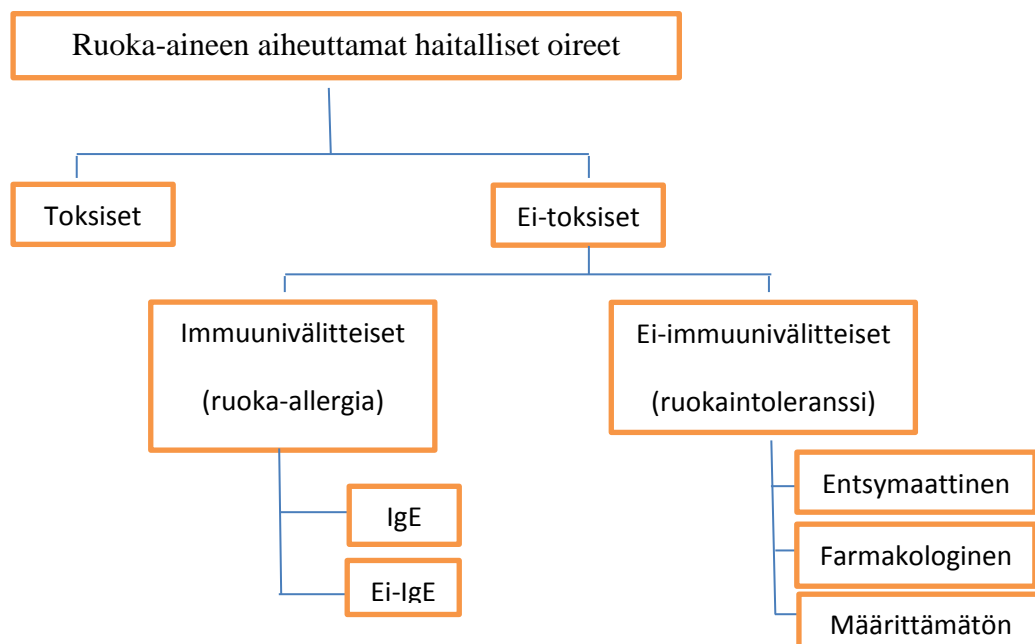
Herkistyminen syntyy puolustusjärjestelmän kohdatessa allergeenin, jonka seurauksena alkaa IgE-luokan vasta-aineiden muodostuminen. Allergian kehittymisessä on kaksi vaihetta. Ensimmäinen vaihe on sensitaatio I. herkistyminen, mikä ei tuota oireita. Sensitaatio tapahtuu, kun keho kohtaa allergeenin, tunnistaa sen vieraaksi ja valkosolut tekevät siitä muistisolun. Toinen vaihe on allerginen reaktio. Allergisessa reaktiossa vasta-aine kiinnittyy valkosoluihin, kuten basofiileihin ja vapauttaa allergeenin tuhoamiseen kykeneviä hiukkasia. Herkistymisestä henkilölle jää muistijälki puolustusjärjestelmään kyseisestä allergeenistä, jonka se tunnistaa seuraavalla kerralla. (Töyry, 2007, 13).

Allergisia oireita aiheuttavassa tapahtumassa edellä kuvattu allergeenien kiinnittyminen IgE:hen vapauttaa haitallisia hiukkasia, kuten histamiinia ja entsyymejä, jotka lisäävät verenkiertoa kudoksessa sekä nesteiden poistumista pienistä verisuonista. Allergisessa reaktiossa herkistyneet solut reagoivat allergeeniin laukaisemalla B-lymfosyytit tuottamaan IgE-vasta-ainetta. Syöttösolut kiinnittyvät IgE-vasta-aineeseen, ja vapauttavat toksisia granuloita. Tämä aiheuttaa ärsytystä ja se havaitaan kuumotuksena, punoituksena, kutinana, turvotuksena sekä neste-erityksen lisääntymisenä. Myös suoliston ja keuhkojen toiminnassa esiintyy häiriintynyttä toimintaa, joka voidaan havaita vatsakipuina ja hengenahdistuksena. (Töyry, 2007, 12–14.)



## 2.1 Ruoka-aineallergia

Ihmiselle kehittyy ruoka-aineallergia silloin, kun ruuan mukana tulevat immunologisesti aktiiviset allergeenit läpäisevät suolen limakalvon ja käynnistävät puolustusreaktion. (Peuhkuri, Korpela, Juntunen-Backman, 1996, 23). Ruoka-aineista johtuvat haitalliset vaikutukset voidaan jakaa toksisiin (myrkyllisiin) ja ei-toksisiin (ruokayliherkkyys) mekanismeihin (kuvio 1). Nämä voidaan edelleen jakaa joko immunologisiin, kuten tapahtuu ruoka-allergiassa, tai ei-immunologisiin, kuten ruokaintoleranssissa. Immunologinen mekanismi voidaan edelleen jakaa IgE-välitteiseen tai siitä riippumattomaan. (Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2009, hakupäivä 4.2.2012.)



*KUVIO 1 Ruoka-aineiden haittavaikutusten luokittelu. (muokattu: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2009. hakupäivä 4.2.2012.)*

### 2.1.1 Vehnäallergia ja siihen liittyvät proteiinit

Vilja-allergiaa etenkin lapsilla aiheuttavat yleisesti ohra, ruis, kaura ja vehnä. Vehnä on yksi kolmesta maailman eniten tuotetuista satokasveista. Vehnästä ja etenkin täysjyvätuotteista saadaan tarpeellisia aminohappoja, mineraaleja ja vitamiineja sekä hyödyllisiä fytokemikaaleja ja ravintokuitua. Kuitenkin vehnätuotteiden tiedetään aiheuttavan suu-

ren määrän haitallisia oireita ihmisillä, joita ovat intoleranssityyppiset-oireet, kuten ke-  
liakia ja allergiat, esimerkiksi hengitystie- ja ruoka-allergiat. (Shewry, P. R., 1537.)

Vehnäjyvä koostuu kolmesta pääkomponentista: tärkkelyksestä, kuidusta ja proteiini-  
neista. Vehnäproteiinit jaetaan neljään ryhmään: albumiineihin, globuliineihin, prola-  
miineihin ja gluteniineihin. Näiden proteiinien osuus on noin 10–15% vehnäjäyvän kui-  
vapainosta. (Tatham, A. S. & Shewry, P. R. 1713.) Vehnän aiheuttamassa allergiassa  
oireita aiheuttavat viljan valkuaisaineet eli proteiinit kuten gluteiini ja gliadiini. Nämä  
saavat elimistössä aikaan puolustusreaktion käynnistymisen ja proteiineja kohtaan alkaa  
vasta-aineiden muodostuminen. (Talsta, 2011, hakupäivä 1.3.2013).

### **2.1.2 Maitoallergia ja siihen liittyvät proteiinit**

Maito on elintärkeä ravintoaine imeväisikäisille ja sitä kulutetaan eri muodoissa myös  
myöhemmissä elämänvaiheissa. Rintamaidon mikro- ja makroravinteet eli proteiinit,  
rasvahapot, hiilihydraatit, mineraalit ja vitamiinit muodostavat 12 % maidon kokonais-  
painosta. Näiden ravinteiden avulla mm. kehittyy immuunipuolustus, estetään patogee-  
nien kolonisaatiota ja edistetään normaaliflooran kasvua suolistossa. (D'Alessandro, A.,  
Scaloni, A. & Zolla, L. 2229.)

Kaikki imeväisikäiset eivät voi juoda äitinsä maitoa ja joutuvat näin kosketuksiin mui-  
den maitojen kuten lehmänmaidon kanssa. Lehmänmaito sisältää noin 20 eri proteiinia,  
jotka voivat potentiaalisesti aiheuttaa allergisia oireita, mutta vain muutamien on todettu  
olevan hyvin allergeenisia. Lehmänmaidon proteiinit jaetaan kaseiineihin ja heraproteiini-  
neihin, joita on suhteessa 4:1. Kaseiineihin kuuluvat alfa-kaseiinin muodot s1 ja s2, be-  
takaseiini ja gammakaseiinin muodot 1, 2 ja 3 sekä kappa-kaseiini. Näistä alfa-kaseiinit,  
betakaseiini ja kappa-kaseiini esiintyvät itsenäisinä proteiineina maidossa ja gammakasei-  
iini syntyy betakaseiinin hydrolyysin kautta. Heraproteiineihin kuuluvat alfa-  
laktalbumiini, beta-laktoglobuliini, immunoglobuliinit, naudan seerumin albumiini ja  
laktoferrini. Näistä beta-laktoglobuliinia on eniten, noin 50 %. (Restani, P., Ballabio,  
C., Di Lorenzo, C., Tripodi, S. & Alessandro, F. 47-48.)

## 2.2 Siedätyshoito

Ruoka-aineallergian hoitona voidaan käyttää siedätyshoitoa, jos IgE-välitteinen allergia aiheuttaa merkittäviä oireita tai ruoka-aineen välttäminen on muuten hankalaa. (Suomalainen Lääkäriseura Duodecimin, 2011, 21.01.2012.) Siedätysoidolla tarkoitetaan elimistön totuttamista allergeenille. (Haahtela, 2007, 106). Ruoka-aineen siedätys-hoidossa potilaalle annetaan tutkitusti allergisia reaktiota aiheuttavaa ruoka-ainetta, joka sisältää allergeeninä toimivaa proteiinia. Allergiaa aiheuttavan antigeenin määrää suurennetaan joka kerta, kunnes saavutetaan ns. ylläpitoannos. (Tarnanen, Valovirta & Kukkonen-Harjula, 2011, hakupäivä 21.1.2012.)

Ennen hoitoa potilas on noudattanut tiukkaa eliminaatioruokavaliota, koska riski altistuksesta voisi johtaa vaikeisiin allergisiin oireisiin. Ruoka-ainesiedätyshoitoa voidaan antaa 5-vuotiaille tai sitä vanhemmille. Pääasiassa hoitoa annetaan lapsille, joilla on tutkittu ja todettu IgE-välitteinen, merkittäviä oireita aiheuttava ruoka-aineallergia. Ruoka-ainesiedätys on vielä kliinistä tutkimusta ja siedätyshoitoa mm. maidolle ja vehnälle annetaankin yliopisto- ja keskussairaaloissa allergisten sairauksien tutkimiseen ja hoitoon perehtyneen lääkärin johdolla. Myös perheen tuki potilaalle on tärkeää, ja hoito vaatii jopa vuosien sitoutumista. (Tarnanen ym., 2011, 59.)

### **3 ELIMISTÖN PUOLUSTUSJÄRJESTELMÄ**

Veren valkosolut jaetaan kolmeen tyyppiin, granulositytteihin, monosyytteihin ja lymfositytteihin eli imusoluihin. Lymfositytit jaetaan toistensa kanssa vuorovaikutuksessa oleviin B- ja T-lymfositytteihin, jotka edelleen jaetaan toimintansa mukaan auttajasoluihin, säätelysoluihin sekä T-soluihin. (Haahtela, 2007, 32.) Kun elimistö kohtaa allergenin, muodostuu vasta-aineita. Kun allergian aiheuttaja reagoi vasta-aineiden kanssa syöttösolun pinnassa, syöttösolusta vapautuu histamiinia, verisuoniin vaikuttavia ja tulehdussoluja paikalle kutsuvia aineita. Tämän seurauksena esiintyy erityyppisiä reaktioita riippuen kohde-elimistä, kuten ruoka-aineallergioissa vatsavaivoja. (Allergiat, 2012, hakupäivä 26.2.2013)

#### **3.1 Lymfosityttien synty**

T-solut eli T-lymfositytit ovat soluvälitteisen immunitetin toteuttajia, sillä ne toimivat yhdessä B-lymfosityttien kanssa ja huolehtivat opitusta eli hankinnallisesta immunitetistä. T-lymfositytit tunnistavat elimistölle vieraita aineita ja tuhoavat infektoituneita soluja kun B-lymfositytit toimivat taas humoraalisesti vierasaineita vastaan. Antigeenisiksi kutsutaan osaa, joka aiheuttaa immuunipuolustuksen aktivoitumisen. Antigeeni voi olla mikrobin osa tai rakenne. Autoimmuuni-tapauksessa antigeeninä toimii elimistön oma rakenne. (Ahveninen, C. & Korpipää, L. hakupäivä 25.10.2012.)

Allergioissa vaikuttavat lymfositytit ovat immunologisia soluja, jotka toimivat elimistön puolustuksessa ja aktivoivat spesifisen immuunipuolustuksen. B-lymfositytit muodostavat puolustusjärjestelmän vasta-aineita tuottavan osan ja T-lymfositytit vastaavat soluun sidotusta immunitetistä. (Ruutu, Rajamäki, Lassila & Porkka, 2007,29.)

T-lymfosityttejä on kahta päätyyppiä, sytotoksisia CD8-tappaja-T-soluja ja CD4-auttaja-T-soluja. Kypsymisen aikana T-soluista tulee joko tappaja- tai auttajasoluja, riippuen siitä millaisia antigeenireseptoreita sillä on pinnassaan. Muita T-solutyyppejä

ovat muisti-T-solut, luonnolliset tappaja-T-solut (natural killers T cells eli NKT-solut) ja säätelijä-T-solut. (Ahveninen, C. & Korpipää, L. Hakupäivä 25.10.2012.)

Kun lymfosyytit kohtaavat spesifisen antigeeninsä ne alkavat jakaantua. Tämä on merkki siitä, että lymfosyyttipopulaatiossa on kyseessä olevalle antigeenille reagoivia yksilöitä. Näin saadaan selville reagoivien eli vastetta antavien solujen osuus solupopulaatiossa. Tällainen tilanne voidaan järjestää keinotekoisesti laboratoriossa kasvattamalla valkosoluja käyttämämme tekniikan avulla ja proliferaatiota voidaan mitata virtaussytometrillä tai tymidiinileimalla.

Erilaiset tekijät vaikuttavat proliferaatiovasteen määrään ja tästä vaikutuksen aiheuttavat eri konsentraatioiset proteiinit. Jos proliferaatiota tapahtuu liian vähän, ei synny vastetta. Jos proliferaatiota tapahtuu liikaa, voi vaste syntyä liiallisen antigeenimäärän takia. Liiallinen proliferaatio voi olla jopa toksinen.

### **3.2 Interleukiini-2 (IL-2)**

Interleukiini-2 (IL-2) on T-lymfosyyttien erittämä kasvutekijä, joka stimuloi valkosolujen jakautumista ja vahvistaa niiden sytotoksisuutta (Vihinen, 2011, hakupäivä 9.2.2012). IL-2 on sytokiineihin kuuluva viestinvälittäjäproteiini, joka on osa immuunisysteemiämme. IL-2:n vaikuttaa immuunisoluihin kuten T-soluihin, mutta myös Natural Killer- eli tappajasoluihin kiihdyttämällä niiden kasvua ja solunjakautumista. Näin aktivoituneiden solujen määrä kasvaa. (Dunn, 2004, hakupäivä 9.2.2012.) Interleukiini-2:n vaikutus on sekä autokriininen että parakriininen, koska sen vaikutus kohdistuu sitä itse erittäneeseen soluun, mutta myös lähistöllä oleviin samanlaisiin soluihin (Törrönen, 2006, hakupäivä 9.2.2012.)

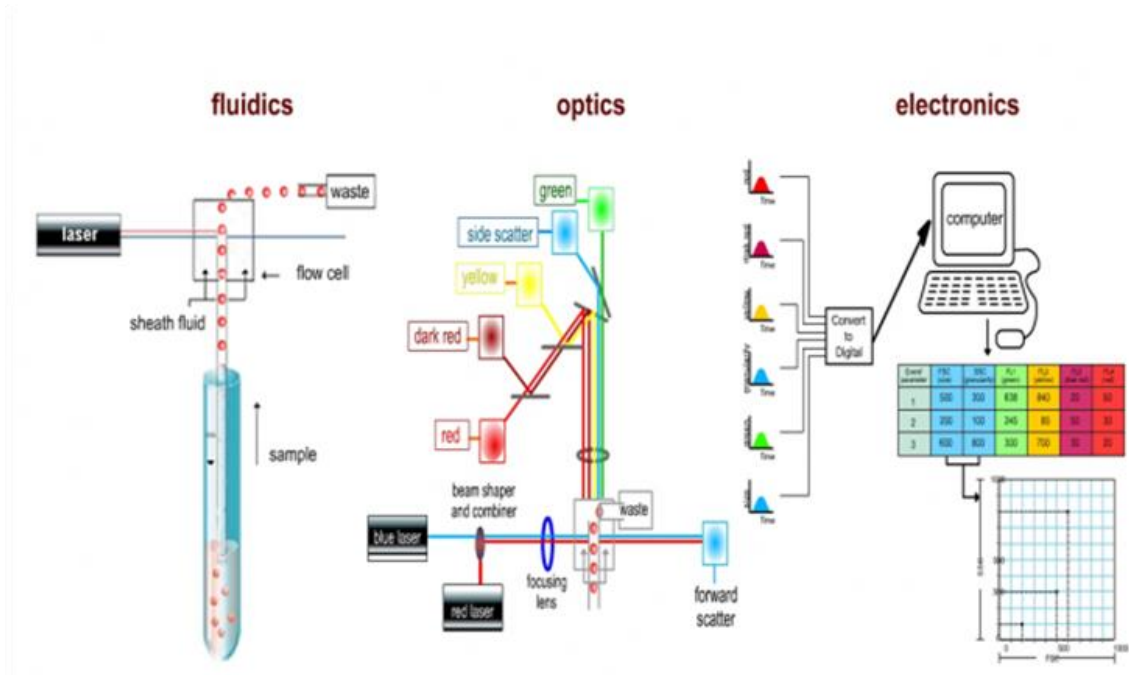
## 4 VIRTAUSSYTOTOMETRIA

Virtaussytometria FCM (Flow Cytometry) on menetelmä solujen tai partikkelien mittaamiseen nestevirrasta. Menetelmällä voidaan samanaikaisesti sekä laskea, että tunnistaa ja lajitella erilaiset solut tai partikkelit, kun ne kulkevat valonsäteen, yleensä lasersäteen läpi. Mittaus on fluoresenssiin perustuva, missä fluoresoivalla aineella merkityt solut kulkevat lasersäteen läpi ja solun lähettämän emission voimakkuus mitataan. Solut analysoidaan sekä valosironnan että fluoresenssin perusteella, joten laitteella voidaan tunnistaa solupopulaatioita toisistaan solun koon, rakenteen sekä solureseptorien perusteella. Lajittelevista sytometreistä käytetään nimitystä FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). (Becton Dickinson, 2012, hakupäivä 4.2.2012.)

Virtaussytometrien toiminta perustuu yksittäisten solujen virtaukseen valonlähteen läpi. Analysoitavat partikkelit saatetaan solususpensioksi ja imetään näyteputkesta kapeana virtana johtaen virtauskyvetiin. Kyvetissä solut fokusoidaan hydrodynaamisesti vaipanesteen avulla kulkemaan yksitellen lasersäteiden läpi. Laservalon osuessa soluun siihen kiinnittynyt fluoresoiva yhdiste virittyy tietyllä aallonpituudella ja emittoi korkeammalla aallonpituusvälillä. Fluoresenssin lisäksi soluista mitataan valosironna, sillä solun kulkiessa laservalon läpi, valo siroaa kaikkiin suuntiin. Suorasironna (FSC) on eteenpäin siroavaa valoa, joka indikoi solujen tai partikkeleiden suhteellista kokoeroa. Sivusironna (SSC) on pystysuoraan tulevaan valoon nähden siroavaa valoa, joka kertoo solun granulaarisuudesta, sillä soluelimet siroavat valoa. (Becton Dickinson, 2012, hakupäivä 4.2.2012.)

Virtaussytometrillä voidaan samanaikaisesti laskea ja eritellä näytteessä olevat solut, kromosomit, bakteerit ja helmet. Kaikki sytometrillä mitattavien näytteiden tulee olla suspensoituna nesteeseen. Sytometrillä voidaan mitata partikkeleita joiden läpimitta on 0,2-14 µm eli aina bakteereista monosyytteihin. Joillakin laitteilla voidaan mitata vielä suurempiakin partikkeleita. (Becton Dickinson, 2012, hakupäivä 4.2.2012.)

Virtaussytometri koostuu kolmesta pääosasta, nesteen virtausjärjestelmästä, optiikasta ja elektroniikasta (kuvio 2). Nämä kaikki osat toimivat yhtäaikaaisesti vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. (Becton Dickinson, 2012, hakupäivä 4.2.2012.)



KUVIO 2 Virtaussytometrin pääkomponentit (muokattu: Boston University Core Laboratories & Facilities Flow Cytometry Laboratory, 2011, hakupäivä 3.2.2012.)

## 6 TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tarkoituksena oli optimoida laboratoriotestien mittausmenetelmä, jolla pyrittiin selvittämään alin vehnä- ja maitoproteiinien pitoisuus, jota voidaan käyttää antigeenispesifisten lymfosyyttien proliferaatiotesteissä.

Tutkimustehtävänäimme oli löytää pienimmät vasteen antavat proteiinkonsentraatiot tutkittavista antigeeneistä ja selvittää minkälainen vaikutus IL-2:lla on proliferaatioon.

Asetettuja tutkimustehtäviä oli kolme:

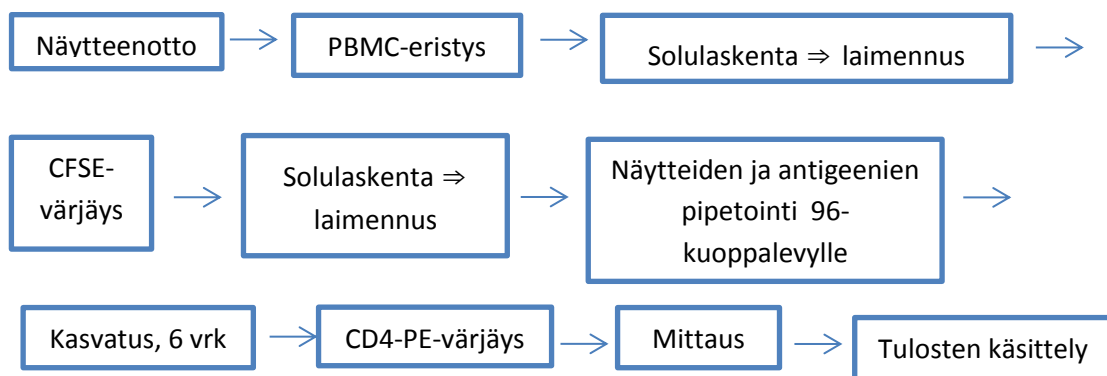
1. Löytää alin pitoisuus antigeeneille, kokovehnä, gliadiini ja gluteeni, mikä antaa mitattavissa olevan vasteen.
2. Löytää alin pitoisuus antigeeneille,  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\kappa$ -kaseiinit,  $\alpha$ -laktalbumiini ja  $\beta$ -laktoglobuliini, mikä antaa mitattavissa olevan vasteen
3. Selvittää vaikuttaako sytokiini IL-2 solujen proliferaatioon ja miten voimakkaasti.



## 7 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

Laboratoriotyövaiheet suoritimme dosentti Petri Kulmalan työryhmässä Oulun yliopiston Diagnostiikanlaitoksen Mikrobiologian ja immunologian osastolla kevään 2012 aikana. Ohjaajina toimivat FM Tiina Kirveskoski, FM Minna Kihlström sekä bioanalytikko Katri Holappa yhdessä dosentti Petri Kulmalan kanssa. Työryhmä antoi käyttöömmme kaikki tarvittavat reagenssit, välineet ja laitteet sekä Tiina Kirveskosken ja Katri Holapan suunnittelemat työohjeet.

Laboratoriotyövaiheet koostuivat kymmenestä laajemmasta työvaiheesta (kuvio 3), jotka sisälsivät mm. sentrifugointeja, laimennuksia ja eripituisia inkubointeja. Täydelliset työohjeet ovat liitteenä (liitteet 1,2).



KUVIO 3 Proliferaatiokokeen laboratoriotyövaiheet.

### 7.1 Antigeenien valmistaminen

Tutkimuksen tilaaja oli päättänyt valita tutkittavaksi seuraavat antigeenit eli proteiinit ja niiden pitoisuudet. Vehnän proteiinit olivat gluteeni, gliadiini ja kokovehnä. Tutkittavat pitoisuudet olivat jokaisella proteiinilla 5 µg/ml, 10 µg/ml ja 20 µg/ml. Maidon proteiinit olivat α-kaseiini, β-kaseiini, κ-kaseiini, α-laktalbumiini ja β-laktoglobuliini. Näiden proteiinien pitoisuudet olivat 50 µg/ml, 100 µg/ml ja 200 µg/ml. IL-2-testissä käytettiin IL-2-pitoisuuksina 5U/ml, 20U/ml ja 100U/ml. Proteiineina IL-2-testissä olivat gluteeni

ja gliadiini, joiden molempien pitoisuus oli 20 µg/ml, sekä α-kaseiini ja β-laktoglobuliini, ja näiden molempien pitoisuus oli 100 µg/ml. Antigeeniliuokset valmistettiin kaupallisista reagensseista punnitsemalla ja liuottamalla. Liuokset jaettiin sopivan kokoisiin käyttöeriin ja säilytettiin pakastimessa.

## **7.2 Tutkimusaineiston keruu**

Laboratoriotestien suorittamiseen tarvittavat verinäytteet otettiin satunnaisesti valituilta henkilöiltä, ja aineiston keruu perustui täysin vapaaehtoisuuteen. Jokaiseen asetettuun tutkimuksen osa-alueeseen tarvittiin alkuperäisen suunnitelman mukaan kymmenen henkilön verinäyte, jotka mahdollisuuksien mukaan pyrittiin ottamaan samoilta henkilöiltä. Lopulta päädyimme kuitenkin ottamaan viimeiseen eli IL-2-tutkimukseen mukaan vain seitsemän tutkittava näytettä tutkimuksen tilaajan näin päätettyä. Ennen näytteen luovuttamista tutkimukseen osallistuva henkilö palautti kaavakkeen, jossa suostumus hyväksyttiin allekirjoituksella. Tutkimuksen tekemiselle on PPSHP:n eettisen toimikunnan lupa.

## **7.3 Perifeerisen veren solujen eristys**

Työ aloitettiin ottamalla kokoverinäyte kahteen 8 ml:n CPT-putkeen. Näyte sekoitettiin kääntelemällä putkea rauhallisesti ylösalaisin muutaman kerran. Näytteen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön 20 minuuttia. Näyte sentrifugoitiin 2 tunnin kuluessa sen otosta 1650G/20/RT, jotta kokoverestä saatiin eristettyä yksitumaiset solut. Tätä vaihetta kutsuttiin PBMC-eristykseksi (PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells). Sentrifugoinnin jälkeen PBMC-gradientti sekoitettiin plasmaan kääntelemällä putkea muutaman kerran ylösalaisin rauhallisesti. Plasma, jossa valkosolut olivat sekoittuneena, pipetoitiin steriiliin 15 ml:n putkeen, johon lisättiin 1xPBS:a (PBS = Phosphate Buffered Saline) eli fosfaattipuskuria niin, että kokonaistilavuus oli 15 ml. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin 300G/15/RT. Tämän jälkeen poistettiin supernatantti ja liuotettiin uudelleen pohjassa oleva solumassa 10ml:an 1x PBS:ä. Seuraavaksi näyte sentrifugoitiin 300G/10/RT ja supernatantti poistettiin.

## 7.4 CFSE-värjäys

CFSE-värjäys (CFSE = Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) on erityisesti jakaantu-  
neiden ja jakaantumattomien solujen erottamiseen sopiva fluoresoiva värjäys. CFSE-  
värjäystä varten sentrifugoitu solupelletti uudelleen liuotettiin 1 ml:an 1x PBS:ä. Tästä  
soluliuksesta otettiin 10 µl mikroputkeen, jonne lisättiin 190 µl 1x PBS:ä ja sekoitet-  
tiin. Tehty laimennos oli 1:20.

Valkosolut laskettiin mikroskoopilla Bürker-kammiossa 40x-objektiivilla. Yhdestä A-  
ruudusta saatu tulos kerrottiin 200 000, jolloin saatiin absoluuttinen solumäärä 1 ml:ssa.  
CFSE-väri laimennettiin 10 mM DMSO-kantaliuoksesta (DMSO = Dimethyl Sulfoxide)  
5 mM:ksi 1x PBS:llä. Tämä tarkoitti käytännössä, sitä että 1 µl CFSE-kantaliuosta ja  
999 µl 1x PBS:ä sekoitettiin keskenään.

Solulaskennan jälkeen solut laimennettiin  $2 \times 10^6$  solua/ml, josta lopputilavuuden 1:5 oli  
CFSE-väriä. Seosta inkuboitiin 8 minuutin ajan  $+37^\circ\text{C}$  vesihauteessa valolta suojattuna.  
Inkuboinnin jälkeen putkeen lisättiin 15 ml:n merkkiviivaan asti kylmää kasvatusme-  
diumia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 5 minuutin ajan. Tässä vaiheessa laminaarista  
sammutettiin valo, koska CFSE-väri hajoaa valon vaikutuksesta. Myös seuraavat työ-  
vaiheet tehtiin ilman laminaarivalaistusta. Inkuboinnin jälkeen näyte sentrifugoitiin  
400G/5min/RT ja supernatantti poistettiin. Solunappi uudelleen liuotettiin 1ml kasva-  
tusmediumia.

## 7.5 Antigeenien lisäys ja kasvatus

Työ jatkui steriilinä laminaarikaappityöskentelynä soluviljelylaboratoriossa. Verinäyt-  
teestä erotettiin leukosyytit, jotka pestiin ja CFSE-värjäyksen jälkeen siirrettiin 96-  
kuoppalevyille. Kuoppalevyille lisättiin ohjeiden mukaiset negatiiviset (neg) ja positiivi-  
set kontrollit. Negatiivisena kontrollina toimi muutoin samanlainen suspensio kuin anti-  
geeninäytteissä, mutta ilman antigeeniä. Jokaiseen kaivoon oli tarkoitus saada noin

8000 - 10000 solua. Positiivisena kontrollina toimivat Tetanus Toxoid-reagenssi (TT), koska tetanus-rokote kuuluu kansalliseen rokotusohjelmaan ja siten kaikilla tutkittavilla positiivinen kontrolli todennäköisesti antaisi vasteen. Toisena positiivisena kontrollina olivat ns. helmet eli beadit (CD3) (Invitrogen Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28). Helmet on tarkoitettu ihmisen T-solujen aktivaatioon, eli CD4+ T-solujen, CD8+ T-solujen, polyklonaalisten tai antigeenispesifisten solujen aktivaatioon (Life Technologies Corporation, hakupäivä 25.10.2012).

Tämän jälkeen kuoppalevyille lisättiin tutkittavat vehnänproteiinit gliadiini (Glia), gluteiini (Glut) ja kokovehnä (Veh) sekä maidonproteiinit alfa-, beeta- ja kappakaseiinit,  $\alpha$ -laktalbumiini ja  $\beta$ -laktoglobuliini. Näytteitä ympäröiviin kaivoihin pipetoitiin PBS-liuosta, jonka avulla estettiin näytteiden kuivuminen inkubaation aikana. kuvio 4 on esimerkki pipetointikaaviosta, jota käytimme vehnäproteiinien proliferaatiotesteissä. Käytimme samantyyppistä pipetointikaaviota myös maitoproteiinien proliferaatiotesteissä sekä IL-2-proliferaatiotesteissä. Tämän jälkeen soluja kasvatettiin lämpökaapissa +37°C:ssa/ 5% CO<sub>2</sub> olosuhteissa 6 vuorokauden ajan.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	neg20	neg50	neg100	CD3	TT	Glut5	Glut10	Glut20	Glia5	Glia10	Glia20	Veh5
C	neg20	neg50	neg100	CD3	TT	Glut5	Glut10	Glut20	Glia5	Glia10	Glia20	Veh5
D	neg20	neg50	neg100	CD3	TT	Glut5	Glut10	Glut20	Glia5	Glia10	Glia20	Veh5
E	Veh10	Veh10	Veh10	Veh20	Veh20	Veh20	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
F	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
G												
H												

*KUVIO 4 Vehnäproliferaatioiden pipetointikaavio*

## 6.6 Proliferaation värjäys ja mittaus

Kuudentena inkubaatiopäivänä kuoppalevyt otettiin lämpökaapista ja solut sentrifugoitii kahden minuutin ajan 350G/10°C kuoppalevyn kaivojen pohjalle. Solunapit pestiin 1xPBS:lla ennen PE-värjäystä (PE =Phycoerythrin), joka on yleisesti käytetty fluoresoiva värjäystapa mitattaessa CD4-positiivisia soluja virtaussytometrillä. Laimennettua värjäysliuosta (yhden kaivon annos = 4µl PE-väriä + 46µl 1xPBS) lisättiin kuhunkin kuoppaan 50µl ja inkuboitii jääkaapissa 30 minuutin ajan, jonka jälkeen solut pestiin kahdesti fosfaattipuskurilla. Solut olivat valmiita mitattavaksi virtaussytometrillä.

## 7 TULOSTEN KÄSITTELY

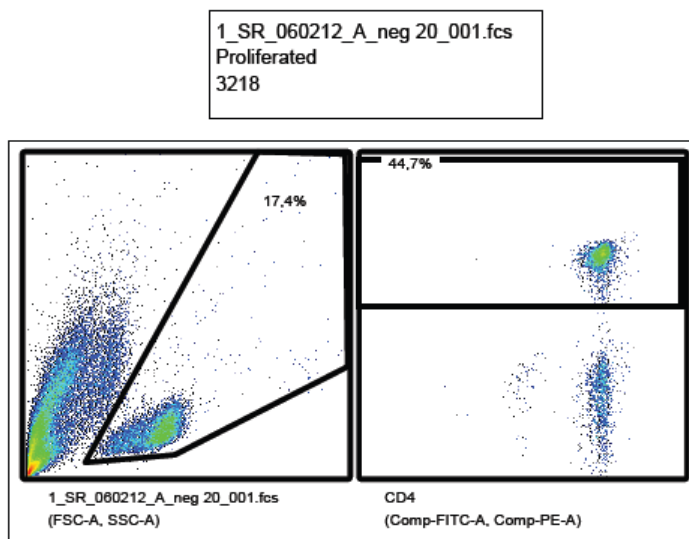
Tulosten analysoinnissa käytettiin FlowJo-nimistä ohjelmaa virtausytometristä saatujen mittausarvojen analysoimiseen, sekä Microsoft Office Excel-taulukkolaskenta -ohjelmaa tulosten jatkokäsittelyyn. FlowJossa on useita eri vaihtoehtoja sirontagrammin tyyppiä, joista valitsimme Pseudocolour Dot Plot -grammin, koska sen avulla tietoa ei katoa jos soluja on tietyllä alueella runsaasti. Solutiheyttä kuvataan eri väreillä, joten sitä on helppo arvioida.

Käytimme FlowJo:ssa kahta erilaista analysointitekniikkaa, ns. Conventional Gating Method eli CGM-tekniikkaa, mistä tulokset saatiin prosentteina (%). Toinen tekniikka oli ns. Division Index Mean-proliferaatio -ohjelma eli DIM-tekniikka, joka kertoo kuinka monta kertaa koko solupopulaatio on jakautunut.

Värjäyksissä käytettyjen fluoresoivien merkkiaineiden intensiteetti puoliintuu solujen jakautuessa eli jokainen uusi solupopulaatio omaa vain puolet edellisestä intensiteetistä. Proliferaatio-ohjelma käyttää erilaisia käyränsovitusmenetelmiä, jotka osaavat paikallistaa ja identifioida Gaussinkäyrän mukaisia jakautumia fluoresenssi-intensiivisyyden mukaan. Ohjelma tuottaa paljon numeerista tietoa mm. jakautumisindeksi (Division index), proliferaatioindeksi (Proliferation index) ja prosenttinen jakauma (Percent divided). Jakautumisindeksi kertoo kuinka monta kertaa alkuperäinen solupopulaatio on keskimäärin jakautunut, sisältäen myös solut jotka eivät ole jakaantuneet kertaakaan. DIM-tekniikassa olimme kiinnostuneet juuri tästä jakautumisindeksistä saadusta tiedosta. CGM-tekniikan avulla selvitimme miten monta prosenttia soluista on jakautunut yhden tai useamman kerran.

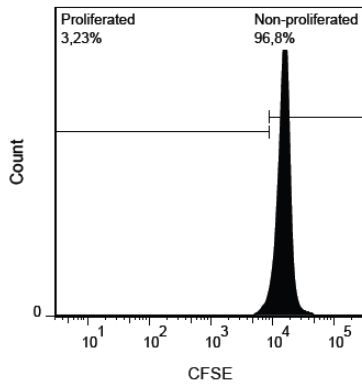
Tulosten analysointia ohjasi FM Minna Kihlström, jolla on kokemusta käytettävistä ohjelmista, ja jotka vaativat perehtyneisyyttä ja aiempaa osaamista. Hän aloitti analysoinnin rajaamalla virtausytometrin antaman sirontagrammin kuvasta kaikkien solujen joukosta lymfosyytit, joka näkyy kuviossa 5 vasemmalla puolella.

Sirontagrammissa x-akselilla on FITC-värjäys (Fluorescein Isothiocyanate) eli meidän tapauksessamme CFSE-värjäys ja y-akselilla CD4-PE-värjäys. Kuvaajan avulla saimme rajattua lymfosyytipopulaatiosta kiinnostuksen kohteemme eli CD4-positiiviset - lymfosyytit, jotka ovat sirontagrammin oikeassa yläkulmassa. Jos nämä solut jakaantui- vat, puoliintui CFSE-värin määrä ja jakaantuneet CD4-positiiviset solut näkyivät siron- tagrammin yläosassa vasemmalla. Juuri nämä solut olivat lopullinen kiinnostuksen koh- teemme sillä nämä solut syntyvät allergisen vasteen seurauksena. Jos jakaantuneita so- luja oli paljon, ne näkyivät pilvimäisenä muodostelmana, useimmiten niitä oli hyvin vähän.



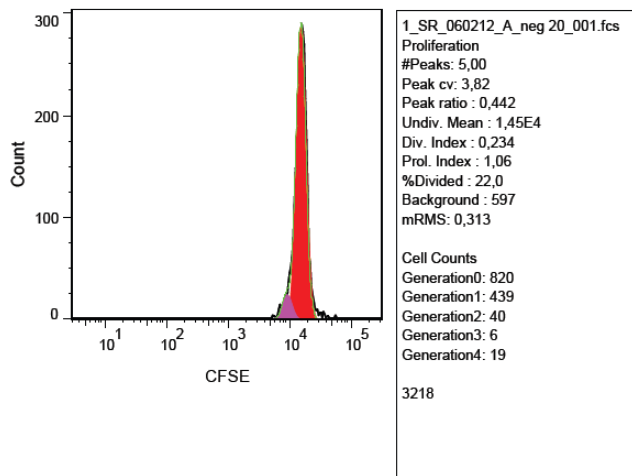
*KUVIO 5 Esimerkki sirontagrammista.*

CGM-tuloksia analysoitaessa käytiin jokaisen mitatun näytteen ensimmäisen negatiivisen/nolla-näytteen kohdalla manuaalisesti asettamassa raja alkuperäissolupopulaation ja jakaantuneiden solujen populaation välille. Kun nollanäytteen kohdalla oli raja asetettu, voitiin samaa asetusta käyttää saman näytteen muissa kuvaajissa. Kuviossa 6 on esimerkki CGM-kuvaajasta, johon nollakohta on muutettu, alkuperäispopulaatio kattaa 96,8 % kaikista soluista ja jakaantuneiden solujen määrä on 3,23%.



*KUVIO 6 Esimerkki CGM-kuvaajasta.*

Meidän tehtävänä oli käydä raakadataa läpi DIM-tulosten osalta. Jokaisesta mitatusta näytteestä FlowJo antoi kullekin mittaukselle Division Index-arvon, joka kertoo kuinka monta kertaa yksi solu on keskimäärin jakautunut, toisin sanoen kuinka monta sukupolvea solupopulaatiossa on. Jos arvo oli nolla, se tarkoitti etteivät solut olleet jakautuneet lainkaan. Suurin mahdollinen arvo, joka voitiin saavuttaa oli yksi (1). Tämä tarkoittaisi, että kaikki solut ovat jakautuneet ainakin kerran. Poistimme tulosten analysoinnista kaikki sellaiset mittaustulokset, joissa solujen jakautumista ei ollut tapahtunut lainkaan eli division index oli nolla. Myös lähtötilanteen eli Generation 0-tilanteen solumäärää seurattiin, jos soluja oli alun perin liian vähän (alle 500 kpl) hylkäsimme kyseisen mittauksen. Esimerkiksi kuvioista 7 nähdään, että alun perin soluja ollut 820 kappaletta ja jakaantumisindeksi on 0,234. Kuvioista nähdään kirkkaanpunaisella alkuperäisen solupopulaation koko ja pienempi violetti piikki kuvastaa yhtä jakaantuneita solujen sukupolvea.



*KUVIO 7 Esimerkki DIM-kuvaajasta.*

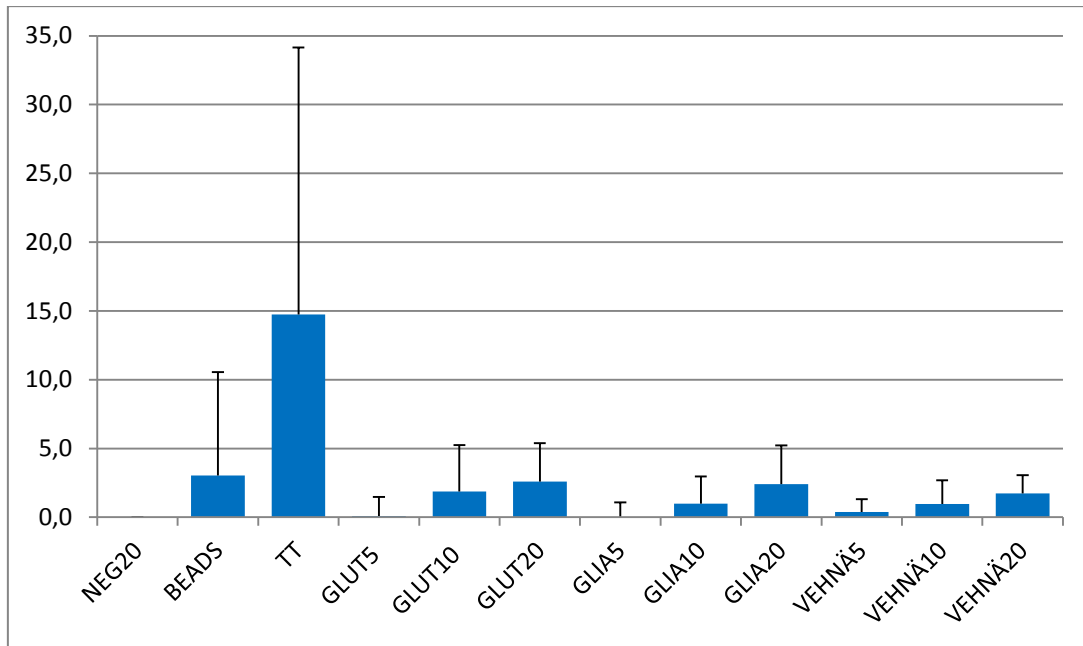


CGM-raakadataa käsiteltiin Excelissä laskemalla jokaisen mittauksen proliferoituneiden solujen osuuden kolmen rinnakkaisen keskiarvo sekä standardipoikkeama. DIM-datasta laskettiin kolmen rinnakkaisen mittauksen jakaantumisindeksin keskiarvo ja standardipoikkeama. Jokaiselle yksittäisen ihmisen näytteille laskettiin siis oheiset arvot ja nämä arvot kerättiin yhteen taulukkoon. Näistä taulukoista kerättiin vielä yksi iso yhteenvetotaulukko, josta pystyttiin vertailemaan keskenään jokaisen ihmisen nollanäytteen, tetanuksen, beadien ja antigeenien keskiarvoja. Näistä keskiarvoista laskettiin vielä keskiarvot ja keskihajonnat, joiden avulla piirrettiin histogrammit joihin lisättiin keskihajontaa kuvaavat pylväät. Yhteenvetotaulukot vehnä- ja maitoproteiinimittauksista sekä IL-2-mittauksista ovat liitteenä (liitteet 4–11)

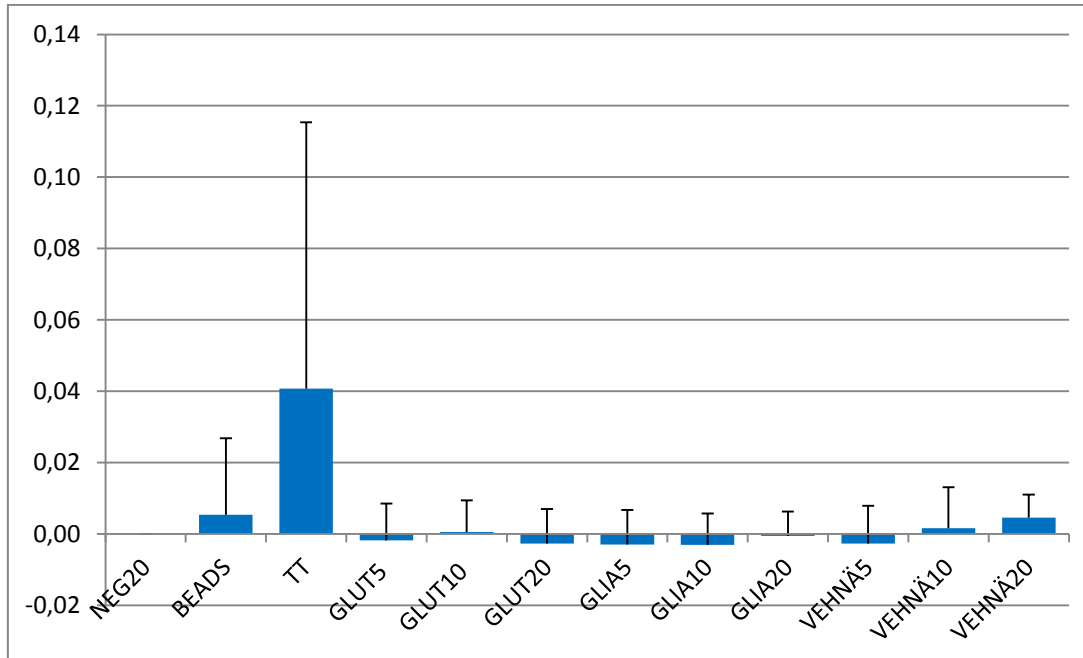
## 8 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Kaikki histogrammikuvaajat kerättiin yhteen ja niitä vertailtiin silmämääräisesti yhdessä Petri Kulmalan ja Minna Kihlströmin kanssa. Myöhemmin teimme tarkempaa vertailua, jossa keskityimme vertaamaan kuvaajia, joissa negatiiviset arvot olivat vähennettyinä. CGM-kuvaajista vertasimme saman antigeeniin eri konsentraatioiden antamia vasteeroja ja niiden lineaarisuutta. DIM-kuvaajista vertasimme saman antigeeniin eri konsentraatioiden antamia solujen jakautumiskertoimen muuttumista ja sen lineaarisuutta. Kahden eri mittausmenetelmän tuloksista saatuja kuvaajia ei verrattu keskenään, mutta tarkastelimme niistä mahdollisia yhdenmukaisuuksia. Kuvaajia tarkasteltaessa tulee ottaa huomioon y-akselin vaihtelevat mittayksiköt, mikä johtuu analyysimenetelmien eroista.

Vehnän CGM-kuvaajasta (kuvio 8) voidaan päätellä vasteen olevan suoraan verrannollinen antigeenin pitoisuuteen. Gluteiini ja gliadiini antavat voimakkaamman vasteen kuin vehnä. Kuvaajan x-akselilla on eri kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista. DIM-kuvaajasta (kuvio 9) ei voi tehdä samansuuntaisia päätelmiä. Gluteiinin ja gliadiinin mittauksissa ei havaita kohonnutta solujakautumista. Poikkeuksena vehnän konsentraatiot 10 µg/ml ja 20 µg/ml, joissa nähdään jakautumista jopa yhtä paljon kuin positiivisessa kontrollissa. DIM-kuvaajassa on x-akselilla eri kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista. Liitteessä kolme (liite 3) on esitetty kaikkien mittaustulosten kuvaajat ennen negatiivisten arvojen vähentämistä.

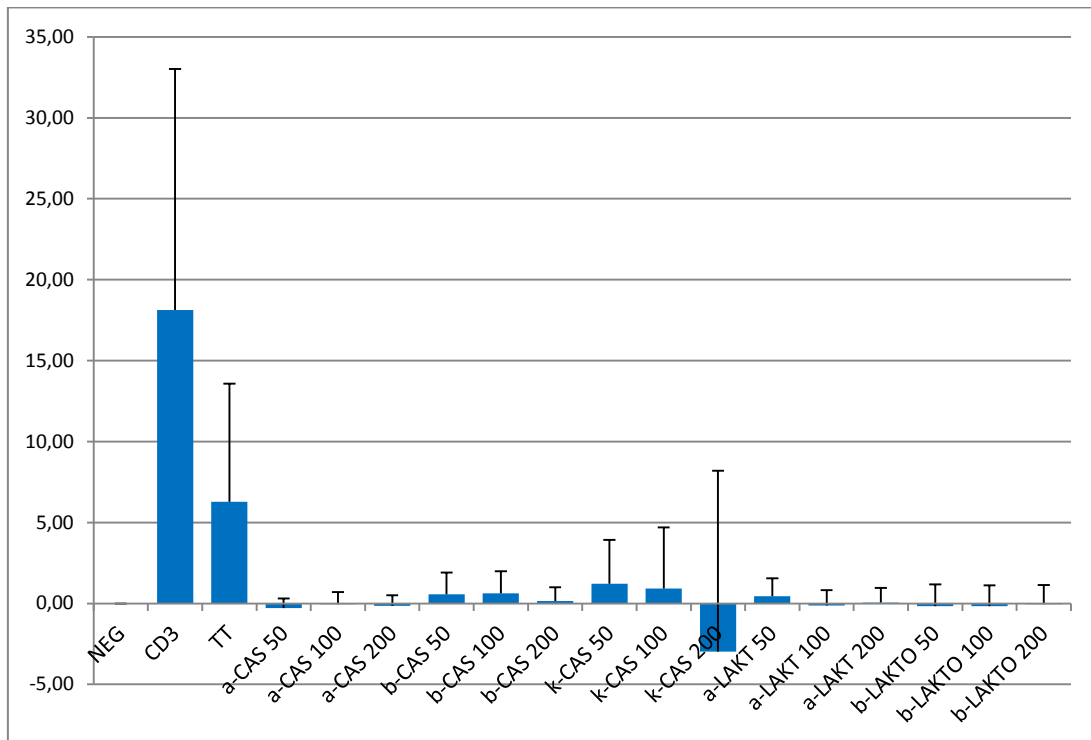


*KUVIO 8 Vehnän CGM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*

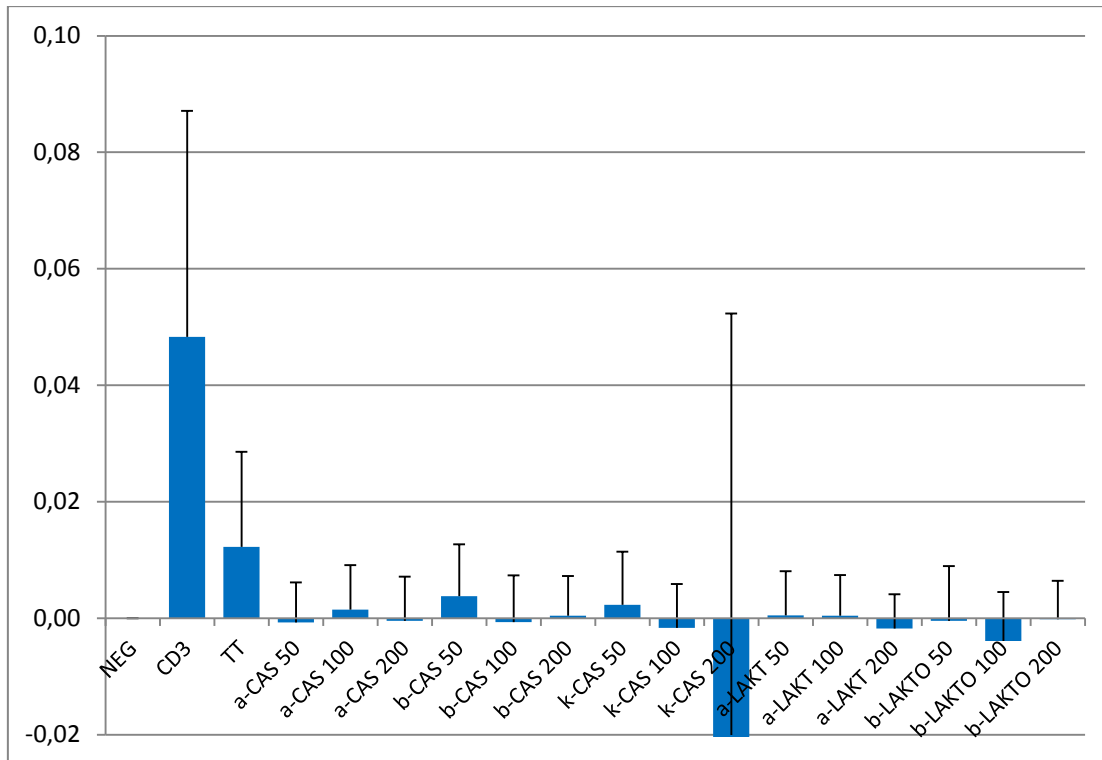


*KUVIO 9 Vehnä DIM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*

Maidon CGM-kuvaajasta (kuvio 10) voidaan havaita, että  $\beta$ -kaseiini ja  $\kappa$ -kaseiini antavat havaittavissa olevan vasteen konsentraatioilla 50  $\mu\text{g/ml}$  ja 100  $\mu\text{g/ml}$ . Vaste havaitaan myös DIM-kuvaajasta (kuvio 11) konsentraatiolla 50  $\mu\text{g/ml}$ . Molemmista, CGM- ja DIM-kuvaajista, ei kuitenkaan voi tehdä päätelmiä, että konsentraatioilla olisi minkäänlaista lineaarista suuntaa. Vasteet ovat hyvin vaihtelevia ja epä johdonmukaisia.

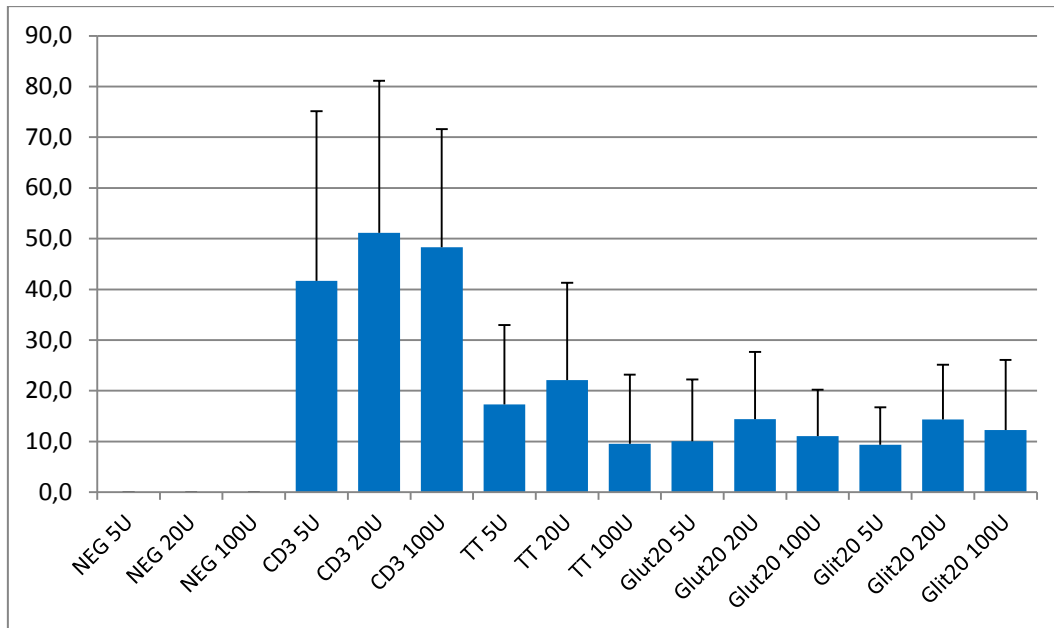


*KUVIO 10 Maidon CGM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*

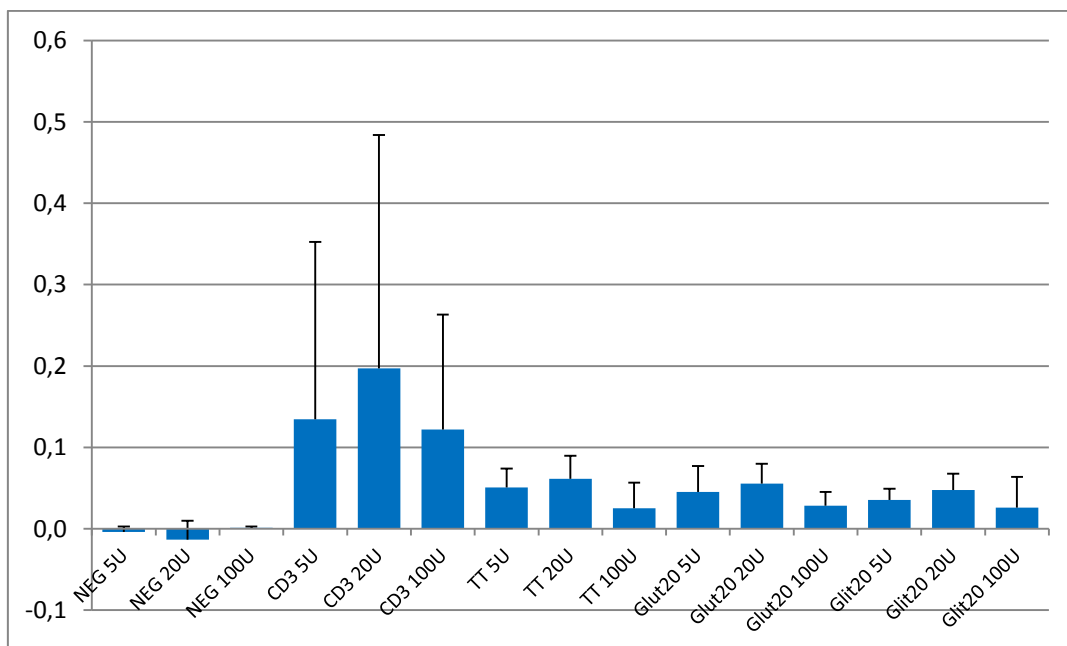


*KUVIO 11 Maidon DIM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*

IL-2:n vaikutus proliferaatioon näkyy CGM-kuvaajasta (kuvio 12) erittäin selkeästi. Vasteet ovat huomattavasti suuremmat interleukiini 2:n vaikutuksesta kuin ilman, jopa yli kuusinkertaiset. CGM-kuvaajasta voidaan selkeästi havaita, että 20U:n IL2-pitoisuus on optimaalinen solujen proliferaatiolle. Tätä pienempi (5U) ja suurempi (100U) konsentraatio antavat noin kolmanneksen pienemmän vasteen. Vehnän IL2- DIM-kuvaaja (kuvio 13) ovat hyvin samanlaiset kuin vastaavat CGM-kuvaajat. Myös näistä näkyy selkeästi, että 20U on optimaalinen IL2-pitoisuus. Huomion arvoista on, että 5U:n interleukiini 2:n lisäys antaa paremman vasteen kuin 100U:n lisäys. Tästä voisi karkeasti päätellä, että 100U tai sitä suuremmat interleukiini-2:n pitoisuudet alkavat olla jo proliferaation kannalta haitallisia.

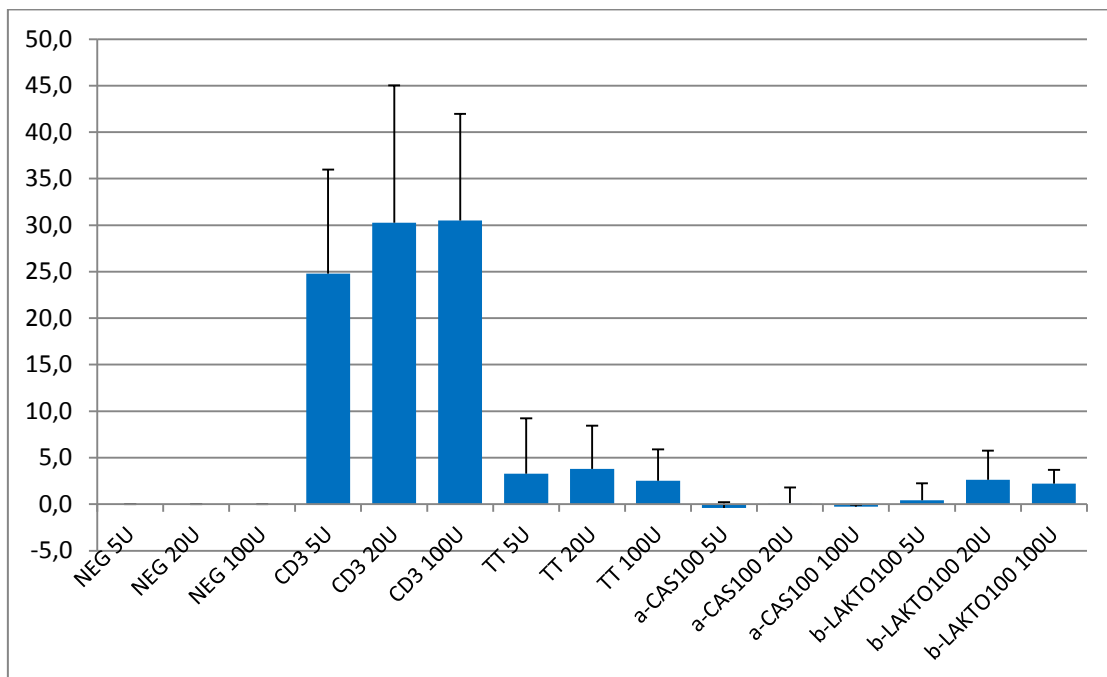


*KUVIO 12 Vehnän IL2-CGM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*

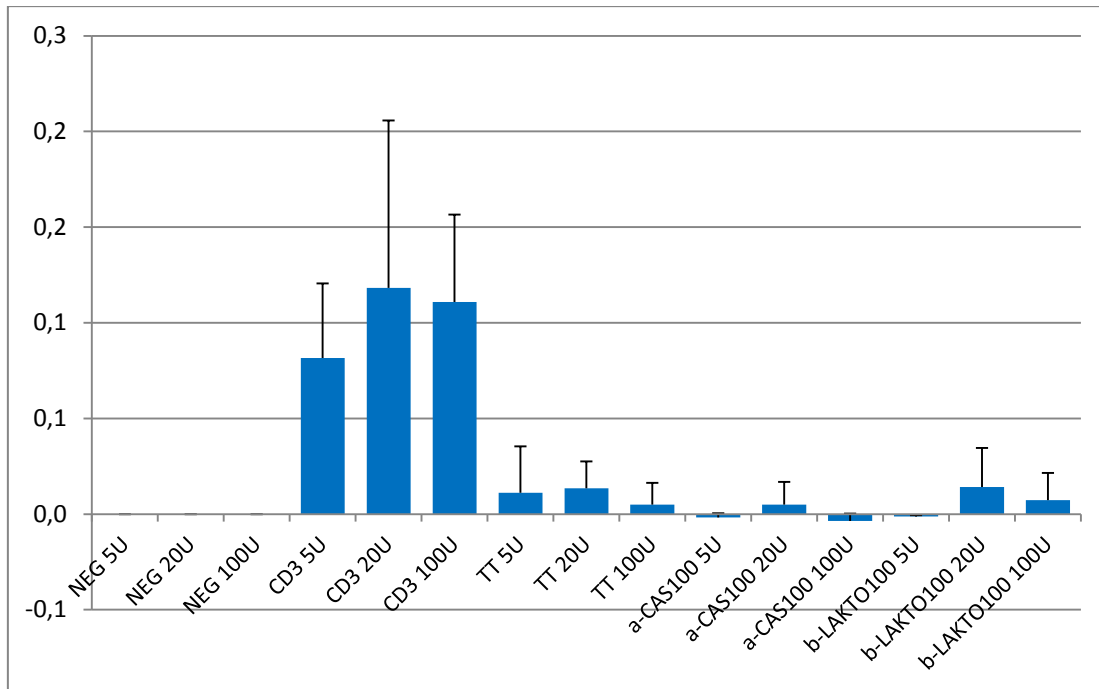


*KUVIO 13 Vehnän IL2-DIM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*

Maidon interleukiini-2 CGM- ja DIM-kuvaajissa (kuviot 14 ja 15) on havaittavissa samansuuntainen vaste, kuin vehnän vastaavissa kuvaajissa. Voimakkain vaste tulee esille 20U:n interleukiini-2 pitoisuudessa, joskin voimakkuus on huomattavasti pienempi.  $\beta$ -laktoglobuliinin 20U ja 100U konsentraatiot antavat kohtuulliset vasteet, jotka mahdollisesti ovat myös huomion arvoisia.



*KUVIO 14 Maito IL2-CGM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*



*KUVIO 15 Maito IL2-DIM-kuvaaja, negatiiviset vähennettynä. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*

Positiivisena kontrollina käytetyt tetanus ja CD3-helmet antoivat positiivisen vasteen kaikissa mittauksissa. Tämä kertoo menetelmän toimivuudesta ja lisää tulosten luotettavuutta. Vehnän ja maidon proliferaatioista saadut vasteet olivat kaiken kaikkiaan hyvin pieniä, joten tulosten yleistettävyyttä tulee käyttää harkiten. Mahdollisten lisämittausten tekeminen eri konsentraatioilla ja tutkimusjoukon kasvattamisella voitaisiin lisätä tulosten luotettavuutta. Selkein tuloksista nähtävä seikka on, että interleukiini-2 vaikuttaa vehnän antigeenien läsnä ollessa solujen proliferaatioon sitä lisäävästi. Maidon tapauksessa se näyttäisi vaikuttavan positiivisesti  $\beta$ -laktoglobuliiniin.

Tutkimustehtävänäimme oli löytää pienimmät antigeenipitoisuudet, joilla saadaan käyttämillämme menetelmillä mitattava vaste. Alla olevassa taulukossa (taulukko 1) on eriteltynä kukin antigeeni ja sen pienin vasteen antava pitoisuus. Antigeenien kohdalla selvissä tapauksissa pystyttiin sanomaan pienin pitoisuus, joissakin tapauksissa se jäi epäselväksi, koska mikään tutkituista pitoisuuksista ei antanut mitattavaa vastetta.



*TAULUKKO 1. Yhteenvedo kunkin antigeenin pienimmästä vasteen antavasta pitoisuudesta*

<b>Antigeeni</b>	<b>Pitoisuus µg/ml CGM</b>	<b>Pitoisuus µg/ml DIM</b>
gluteeni	10	epäselvä
gliadiini	10	epäselvä
kokovehnä	5-10	10
α-kaseiini	50	100
β-kaseiini	50	50
κ-kaseiini	50	50
α-laktalbumiini	50	50
β-laktoglobuliini	epäselvä	epäselvä

Vastaus asettamiimme tutkimustehtäviin oli, että löysimme useimmille antigeeneille pienimmän vasteen antavan pitoisuuden ja IL-2:n vaikutus oli selkeästi kaikkien vehnän antigeenien ja maidon β-laktoglobuliinin yhteydessä proliferaatiota lisäävä.

## 9 POHDINTA

Tutkimuksessa oppimistavoitteenamme oli tutustua ja ymmärtää oman tekemisen kautta, mitä lääketieteellinen tutkimus sisältää ja mistä asioista ja osatekijöistä suurempi kokonaisuus muodostuu. Tähän liittyi tutkimusryhmän ja laitoksen yhteistyö, jonka toimintaan pääsimme tutustumaan. Myös omatoiminen ja itsenäinen työskentely uusien asioiden parissa loi haasteita, mutta antoi myös mahdollisuuden uuden oppimiselle. Uskomme, että perehtyminen aiheeseen liittyvään kirjallisuuteen yhdessä käytännön kanssa auttaa meitä ymmärtämään jatkossa tutkittavia aiheita paremmin ja mahdollisesti hyödyntämään oppia työelämässä. Työn haasteellisuutta lisäsi tieto siitä, että työemme oli osa suurempaa tutkimuskokonaisuutta.

Pystyimme vastaamaan asettamiimme tutkimustehtäviin. Löysimme suurimmalle osalle antigeeneistä pienimmän käytettävissä olevan pitoisuuden ja selvitimme, miten IL-2 vaikuttaa solujen proliferaatioon. Todistaen samalla teorian oikeaksi IL-2:n proliferaatiota lisäävästä vaikutuksesta.

Meillä molemmilla on aiempi laboratorioanalyytikon tutkinto, joten laboratoriotyöskentelyyn kuuluva soluviljelyn herkkä työvaihe sujui ongelmitta. Haastetta sen sijaan loi, toimiminen osana laitoksen työyhteisöä, joka täytyi ottaa huomioon muun muassa laitteiden ja tilojen varaamisessa ja käytössä. Mielestämme sopeuduimme joukkoon hyvin ja saimme tarvittaessa apua ongelmiimme.

Työn määrä yllätti molemmat. Alkukäsityksestä poiketen todellinen työmäärä, sisältäen laboratoriotyöskentelyn, oli huomattavan suuri opinnäytetyön vaatimustasoon nähden. Teimme pelkästään laboratoriotöitä kahden työkuukauden verran. Lisäksi tulosten analysointi osoittautui työteliäämmäksi kuin osasimme odottaa. Yksittäisiä käsiteltäviä tuloksia oli satoja jopa tuhansia ja niiden käsittely vati erityistä tarkkuutta ja huolellisuutta.

Toinen haasteellinen vaihe oli tulosten käsittely, joka vaati erityistaitoja Excelin käytössä. Onnistuimme kuitenkin tulosten käsittelyssä ohjaaja Minna Kihlströmin avustuksella.

Oppimiskokemus oli monikäyttöisen virtaussytometrin periaatteen ja peruskäytön oppiminen. Perehdyimme kattavasti soluviljelyyn sekä solulaskentaan Bürker-kammiolla. Opimme myös kommunikoimaan monikulttuurisessa työyhteisössä.

Jatkotutkimusehdotuksia heräsi työn aikana useita. Yksi niistä voisi olla vehnäproteiinikonsentraatioiden kasvattaminen niin, että kaikille antigeeneille löydettäisiin pienin ja selvästi havaittava pitoisuus. Jatkotutkimusehdotuksena voisi myös olla IL-2-tutkimuksen täydentämistä, niin että kaikille proteiineille olisi mitattuna arvot kymmeneltä henkilöltä. Mielenkiintoista olisi lisäksi tutkia IL-2:n vaikutus käyttäen muitakin antigeenejä, kuin mitä nyt käytettiin. Antigeenien pitoisuuksia voisi myös muuttaa niin, että löytyisi toksinen pitoisuus, jolla proliferaatio estyisi kokonaan.

## LÄHTEET

Ahveninen, C. & Korpipää, L. 2010. T-lymfosyytti. Hakupäivä 26.2.2012.  
<https://wiki.helsinki.fi/display/solu/T-lymfosyytti>

Boston University Core Laboratories & Facilities Flow Cytometry Laboratory. 2011.  
Hakupäivä 3.2.2012 <http://www.bu.edu/flow-cytometry/>.

D'Alessandro, A., Scaloni, A. & Zolla, L. 2010. Human Milk Proteins: An Interatomics and Updated Functional Overview. *Journal of Proteome Research*. 9, 3339-3373.

Dunn, S. 2004. Cancer Guide. Hakupäivä 9.2.2012 [http://cancerguide.org/rcc\\_il2.html](http://cancerguide.org/rcc_il2.html).

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira 2010. Maito. Hakupäivä 3.2.2012  
[http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa\\_elintarvikkeista/ruoka-allergeenit/yleisimmat\\_ruoka-allergian\\_aiheuttajat/maito/](http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa_elintarvikkeista/ruoka-allergeenit/yleisimmat_ruoka-allergian_aiheuttajat/maito/).

Haahtela, T., Hannuksela, M., Mäkelä, M. & Terho, E.O. 2007. Allergia. Helsinki: Duodecim.

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2011. *Immunologia*. Kustannus Oy Duodecim.

Heikkilä, T. 1998. *Tilastollinen tutkimus*. Helsinki: Oy Edita Ab.

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. 2006. Maitoallergia. Hakupäivä 3.2.2012  
<http://www.hus.fi/default.asp?path=1;32;818;1733;1992;1987&voucher=58407045-363F-424B-B003-1B1971C8F1EE>.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. *Tutki ja kirjoita*. 15.-16. painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Jalanko, H. 2009. Allergian perusteet. Hakupäivä 26.10.2012.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=skl00027](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skl00027)

Kaila, M., Korppi, M., Mäkelä, M., Pelkonen, A. & Valovirta, E. (toim.) 2009 Lasten allergiset sairaudet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy

Kokko, L. 2010. Keliakialiitto. Keliakia ja vilja-allergia ovat eri sairauksia. Hakupäivä 1.2.2012 <http://www.keliakialiitto.fi/liitto/nyt/uutiset/?nid=61&ARC=1&Year=2010>.

Koponen, M. 2008. Insinööriyö Metropolia Ammattikorkeakoulu. Maidon proteiinien rajattu hydrolyysi. Hakupäivä 4.2.2012 <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-200811284161>.

Kuitunen, M. 2010. Lasten ruokayliherkkyys ja -allergia. Hakupäivä 20.1.2012 [http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00359&p\\_haku=lasten%20maitoallergia](http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00359&p_haku=lasten%20maitoallergia).

Kuitunen, M. 2010. Lehmänmaitoallergia. Hakupäivä 3.2.2012 [http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00359&p\\_haku=Lehm%E4nmaitoallergia](http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00359&p_haku=Lehm%E4nmaitoallergia).

Life Technologies Corporation. 2012. Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 - for physiological activation of human T cells Hakupäivä 25.10.2012 <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/t-cell-activation-and-expansion/dynabeads-human-t-activator-cd3-cd28.html>.

Lähdesmäki, T., Hurme, P., Koskimaa, R., Mikkola, L. & Himberg, T. Menetelmäpolkuja humanisteille. Jyväskylän yliopisto, humanistinen tiedekunta. Hakupäivä 21.2.2012 <http://www.jyu.fi/mehu>.

Mäkelä, Kulmala, Pelkonen, Remes & Kuitunen, 2011. Ruokasiedätys – uusi ajattelutapa ja hoito ruoka-aineallergioihin. Hakupäivä 26.10.2012 [http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00361&p\\_haku=sied%C3%A4tyshoito%20100%20vuotta](http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00361&p_haku=sied%C3%A4tyshoito%20100%20vuotta)

Restani, P., Ballabio, C., Di Lorenzo, C., Tripodi, S. & Alessandro, F. 2009. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 1 (395), 47-56.

Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila R. & Porkka, K. (toim.). 2007. *Veritaudit*. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Shewry, P. R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* 6 (60), 1537-1553.

Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. 2009a. Käypähoito-suositus Ruoka-allergia (lapset). Hakupäivä 25.10.2012 <http://www.terveysportti.fi/xmedia/hoi/hoi50026.pdf>

Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. 2009b. Ruoka-allergia (lapset). Hakupäivä 4.2.2012 ja 20.2.2012  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/naytaartikkeli/tunnus/hoi50026>.

Suomalainen Lääkäriseura Duodecim 2010. Ruoka-allergia lapsilla. Hakupäivä 20.01.2012 ja 3.2.2012 <http://www.terveysportti.fi/xmedia/khp/khp00048.pdf>.

Suomalaisen Lääkäriseura Duodecim. 2011. Käypähoito suositus siedätyshoito. Hakupäivä 21.01.2012  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/naytaartikkeli/tunnus/hoi14010>.

Suomalaisen Lääkäriseura Duodecim. Allergiat. 2012. Hakupäivä 26.02.2012.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00561](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00561)

Talsta, S., 2011. Keliakia ei ole vilja-allergia. Hakupäivä 1.3.2013  
<http://www.keliakiliitto.fi/liitto/nyt/uutiset/?nid=107>

Tarnanen, K., Valovirta E. & Kukkonen-Harjula K. 2011. Siedätysoidolla helpotusta allergiaa sairastavan arkeen. Hakupäivä 21.01.2012  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/naytaartikkeli/tunnus/khp00030>.

Tatham, A. S. & Shewry, P. R. 2008. Allergens in wheat and related cereals. *Clinical and Experimental Allergy* (38), 1712-1726.

Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. 2012. Ruoka-allergiat. Hakupäivä 17.1.2012.  
[http://www.thl.fi/fi\\_FI/web/fi/aiheet/tietopaketti/ravitsemustietoa/terveys/ruoka\\_allergia](http://www.thl.fi/fi_FI/web/fi/aiheet/tietopaketti/ravitsemustietoa/terveys/ruoka_allergia)  
t.

Terveyden ja hyvinvoinninlaitos. 2007. Suoliston puolustusjärjestelmän pettäminen monen sairauden syynä. Hakupäivä 1.2.2012  
[http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet\\_2007/nro\\_1\\_2007/suoliston\\_puolustusjarjestelman\\_pettaminen\\_monen\\_sairauden\\_syyna](http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2007/nro_1_2007/suoliston_puolustusjarjestelman_pettaminen_monen_sairauden_syyna).

Törrönen, K. 2006. Solubiologia, autokriininen. Hakupäivä 9.2.2012  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/autokriininen/2/>.

Törrönen, K. 2006. Solubiologia, parakriininen Hakupäivä 9.2.2012  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/parakriininen/2/>.

Töyry, J. 2007. Allergiat. Oy UNIpress Ab.

Vihinen, P. 2011. Interleukiini 2 (IL-2) ja melanooma. Hakupäivä 9.2.12  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/nix01816>.

Vilkkä, H. 2005. Tutki ja kehitä. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy.

Welcome to the Introduction to Flow Cytometry Web-Based Training 2012. Hakupäivä 4.2.2012 [http://www.bdbiosciences.com/eu/support/training/itf\\_launch.jsp](http://www.bdbiosciences.com/eu/support/training/itf_launch.jsp).

**PBMC-eristys (peripheral blood mononuclear cells)**

1. Otetaan kokoverinäyte 8 ml:n CPT-putkeen. Anna veren jäähtyä huoneenlämpöön (väh. 20 min)
2. Sentrifugoi CPT -putki 2h kuluessa näytteenotosta 1650 G 20 min RT
3. Sekoita PBMC -gradientti plasmaan kääntelemällä putkea pari kertaa
4. Pipetoi plasma/solut pasteur -pipetillä CPT -putkesta steriiliin 15 ml falconiin ja täytä putki 15 ml:n merkkiin asti 1 x PBS:llä
5. Sentrifugoi 300 G 15 min RT
6. Poista supernatantti ja resuspendoi solut 10 ml:aan 1 x PBS:ää
7. Sentrifugoi 300 G 10 min RT

**CFSE-värjäys**

1. Resuspendoi solut 1 ml:aan 1 x PBS:ää. Ota 10 µl soluliosta eppariin ja lisää 190 µl PBS:ää ja sekoita (= 1:20 laimennos). Laske valkosolut mikroskoopilla Bürker -kammiossa ja kerro yhden A-ruudun tulos 20 000:lla = absoluuttinen solumäärä yhdessä millilitrassa
2. Laimenna 1 µl CFSE-stokkia (10mM DMSO:ssa) 5 µM:ksi lisäämällä 999 µl PBS:ää
3. Laimenna solut  $2 \times 10^6$  solua/ml, josta 1:5 lopputilavuutta on CFSE:tä (esim. lopputilavuus 5 ml = 4ml PBS + 1 ml CFSE, CFSE -konsentraatio 1 µM)
4. Inkuboi soluja 8 min +37 °C:ssa vesihauteessa valolta suojattuna.
5. Lisää putkeen 15 ml:n merkkiviivaan asti kylmää kasvatusmediumia ja inkuboi huoneenlämmössä 5 min (sammuta tässä vaiheessa laminaarista valo, koska CFSE hajoaa valon vaikutuksesta)
6. Sentrifugoi 400 G 5 min RT



7. Resuspensoi solut 1 ml:aan kasvatusmediumia.

### **Antigeenien (proteiinien) lisäys**

1. Ota 10 µl soluliosta eppariin ja lisää 190 µl PBS:ää ja sekoita (= 1:20 laimennos). Laske valkosolut mikroskoopilla Bürker -kammiossa ja kerro yhden A-ruudun tulos 20 000:lla = absoluuttinen solumäärä yhdessä millilitrassa

2. Laimenna solut 667 000 solua /ml kasvatusmediumilla

3. Jaa solut kuoppalevyille 150 µl soluliuosta/kuoppa (= 100 000 solua/kuoppa) ja 50 µl proteiiniliuosta tai kontrollia/kuoppa pipetointikaavion mukaan. Tee kustakin näytteistä kolme rinnakkaista.

a. neg. ctrl 20 (etikkahappo) (2 µl eh +248 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

b. neg. ctrl 50 (5 µl eh +245 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

c. neg. ctrl 100 (10 µl eh +240 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

d. CD3 (posit. ctrl) CD3/CD28-beadit: (1 µl beadeja (pese magneetilla 1 ml:lla 1x PBS) + 4 µl etikkahappo + 396 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa

e. Tetanustoxoid (posit. ctrl) (1,5 µl Tetanus Toxoid + 5 µl etikkahappo 930,5 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

f. Gluteeni 20 µg/ml (2µl glut [10mg/ml) + 248 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

g. Gluteeni 50 µg/ml (5µl glut [10mg/ml) + 245 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

h. Gluteeni 100 µg/ml (10µl glut [10mg/ml) + 240 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

i. Gliadiini 20 µg/ml (2µl glia [10mg/ml) + 248 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

j. Gliadiini 50 µg/ml (5µl glia [10mg/ml) + 245 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

k. Gliadiini 100 µg/ml (10µl glia [10mg/ml) + 240 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

l. Kokovehnä 20 µg/ml (2µl kokovehnä [10mg/ml) + 248 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

m. Kokovehnä 50 µg/ml (5µl kokovehnä [10mg/ml) + 245 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

n. Kokovehnä 100 µg/ml (10µl kokovehnä [10mg/ml) + 240 µl kasvatusmedium) 50 µl/kuoppa

Pipetoi ympäröiviin kuoppiin 200 µl PBS:ää, jotta näytekuopat eivät kuivuisi viljelyn aikana

Kasvatus +37 °C:ssä 6 vrk

### **Proliferaation mittaus**

Tee väricocktail: näytekuoppamäärä (+ pari pipetointivaraa) x 4 µl CD4-PE leimaa + näytekuoppamäärä x 46 µl FACS -puskuria

1. Siirrä solut kuopista 96- V-kuoppalevyille. Pipetoi vastapainolevyille vettä tms. vastaaviin kuoppiin.
2. Sentrifugoi 1650 rpm/2 min/ 10°C
3. Kaada supernatantit pois ja resuspendoi solut 100 µl:aan FACS -puskuria
4. Sentrifugoi 1650 rpm/2 min/10°C
5. Pipetoi 50 µl väricocktailia jokaiseen näytekuoppaan ja resuspendoi.
6. Inkuboi levyä 30 min jääkaapissa.
7. Sentrifugoi 1650 rpm/2 min/10°C
8. Kaada supernatantit pois ja resuspendoi solut 100 µl:aan FACS -puskuria
9. Toista kohdat 7 ja 8. Varo ilmakuplia resuspendoidessa
10. Mittaus FACS Arialla. Mittausta varten näytteet siirretään polystyreeniputkiin. Näytteet on suojattava valolta esim. foliolla ja pidettävä jäissä ennen mittausta

Tarvittavat liuokset:

- a. 1. HSA (= Sigman 45 °C inaktivoitu human AB-seerumi)
- b. 70 % etanoli laminaarin ja välineiden desinfointiin
- c. 1 x PBS (fosfaattipuskuri) ( 50ml 10 x PBS + 450 ml ster. H<sub>2</sub>O)
- d. Kasvatusmedium (RPMI 1640 + antibiootit penicillin/streptomycin 5 ml/500 ml + 25mM HEPES 12,5 ml/500 ml) + 5 % Sigman inaktivoitua humaaniseerumia (=HSA)
- e. CFSE (solujen värjäysliuos) 5 mM (on valmiina pakkasessa 1µl:n erissä eppareissa; jos loppunut, laimenna 1 putken jauhe 18 µl:aan DMSO:ta ja jaa pakkaseen 1 µl:n eriin 1,5 ml eppareihin)
- f. Vehnäproteiinit (laimennetaan kasvatusmedium+ 5 % HSA:han)
- g. FACS -puskuri (500 ml 1 x PBS + 0,5 g BSA (= 0,1%))

Välineitä: automaattipipetti + kertakäyttömittapipetit, steriilit pasteur -pipetit, steriilit filterikärjet, steriilit 1,5 ml epparit, jäteastia, U -pohjainen 96-kuoppalevy

Työskentely tapahtuu laminaarikaapissa. Lämpöhaude päälle +37 °C:een.

### **PBMC-eristys (peripheral blood mononuclear cells)**

1. Otetaan kokoverinäyte kahteen 8 ml:n CPT-putkeen. Anna veren jäähtyä huoneenlämpöön (väh. 20 min)
2. Sentrifugoi CPT -putki 2h kuluessa näytteenotosta 1650 G 20 min RT
3. Sekoita PBMC -gradientti plasmaan kääntelemällä putkea pari kertaa
4. Pipetoi plasma/solut pasteur -pipetillä CPT -putkesta steriiliin 15 ml falconiin ja täytä putki 15 ml:n merkkiin asti 1 x PBS:llä.
5. Sentrifugoi 300 G 15 min RT
6. Poista supernatantti ja resuspendoi solut 10 ml:aan 1 x PBS:ää
7. Sentrifugoi 300 G 10 min RT

## CFSE -värjäys

1. Resuspensoi solut 1 ml:aan 1 x PBS:ää. Ota 10 µl soluliosta eppariin ja lisää 190 µl PBS:ää ja sekoita (= 1:20 laimennos). Laske valkosolut mikroskoopilla Bürker -kammiossa ja kerro yhden A-ruudun tulos 20 000:lla = absoluuttinen solumäärä yhdessä millissä.
2. Laimenna 1 µl CFSE –stokkia (10mM DMSO:ssa) 5 µM:ksi lisäämällä 999 µl PBS:ää
3. Laimenna solut  $2 \times 10^6$  solua/ml, josta 1:5 lopputilavuutta on CFSE:tä (esim. lopputilavuus 5 ml = 4ml PBS + 1 ml CFSE, CFSE -konsentraatio 1 µM)
4. Inkuboi soluja 8 min +37 °C:ssa vesihauteessa valolta suojattuna.
5. Lisää putkeen 15 ml:n merkkiviivaan asti kylmää kasvatusmediumia ja inkuboi huoneenlämmössä 5 min (sammuta tässä vaiheessa laminaarista valo, koska CFSE hajoaa valon vaikutuksesta).
6. Sentrifugoi 400 G 5 min RT
7. Resuspensoi solut 1 ml:aan kasvatusmediumia.

## Antigeenien lisäys maitonäytteiden proliferaatiotestissä

1. Ota 10 µl soluliosta eppariin ja lisää 190 µl PBS:ää ja sekoita (= 1:20 laimennos). Laske valkosolut mikroskoopilla Bürker -kammiossa ja kerro yhden A-ruudun tulos 20 000:lla = absoluuttinen solumäärä yhdessä millissä.
2. Laimenna solut 667 000 solua /ml kasvatusmediumilla.
3. Jaa solut kuoppalevyille **150 µl soluliuosta/kuoppa** (= 100 000 solua/kuoppa) ja **50 µl proteiiniliuosta tai kontrollia/kuoppa** pipetointikaavion mukaan. Tee kustakin näytteistä kolme rinnakkaista (100 000 solua eli **150 µl/kuoppa**; yht. tarvitaan siis 5,4 milj. solua/hlö) seuraavasti:

### a. Negatiivinen kontrolli

- 10 µl PBS
- 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa

### b. CD3/CD28-beadit:

- 1 µl beadeja (Pesu 1x PBS:llä magneetilla)
- 400 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa

- c. Tetanus Toxoid 0,2 µg/ml:**
- 1,5 µl Tetanus Toxoid
  - 935,5 µl RPMI1640
- d. α-kaseiini 50 µg/ml**
- α-cas 2,5 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- e. α-kaseiini 100 µg/ml**
- α-cas 5 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- f. α-kaseiini 200 µg/ml**
- α-cas 10 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- g. β-kaseiini 50 µg/ml**
- β-cas 2,5 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- h. β-kaseiini 100 µg/ml**
- β-cas 5 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- i. β-kaseiini 200 µg/ml**
- β-cas 10 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- j. κ-kaseiini 50 µg/ml**
- κ-cas 2,5 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- k. κ-kaseiini 100 µg/ml**
- κ-cas 5 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- l. κ-kaseiini 200 µg/ml**
- κ-cas 10 µl (*20mg/ml*)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- m. α-laktalbumiini 50 µg/ml**
- α-lactalb 2,5 µl (*20mg/ml*)

- 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- n. α-laktalbumiini 100 µg/ml**
  - α-lactalb 5 µl (20mg/ml)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- o. α-laktalbumiini 200 µg/ml**
  - α-lactalb 10 µl (20mg/ml)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- p. β-laktoglobuliini 50 µg/ml**
  - β-lactglob 2,5 µl (20mg/ml)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- q. β-laktoglobuliini 100 µg/ml**
  - β-lactglob 5 µl (20mg/ml)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa
- r. β-laktoglobuliini 200 µg/ml**
  - β-lactglob 10 µl (20mg/ml)
  - 240 µl RPMI1640 50 µl/kuoppa

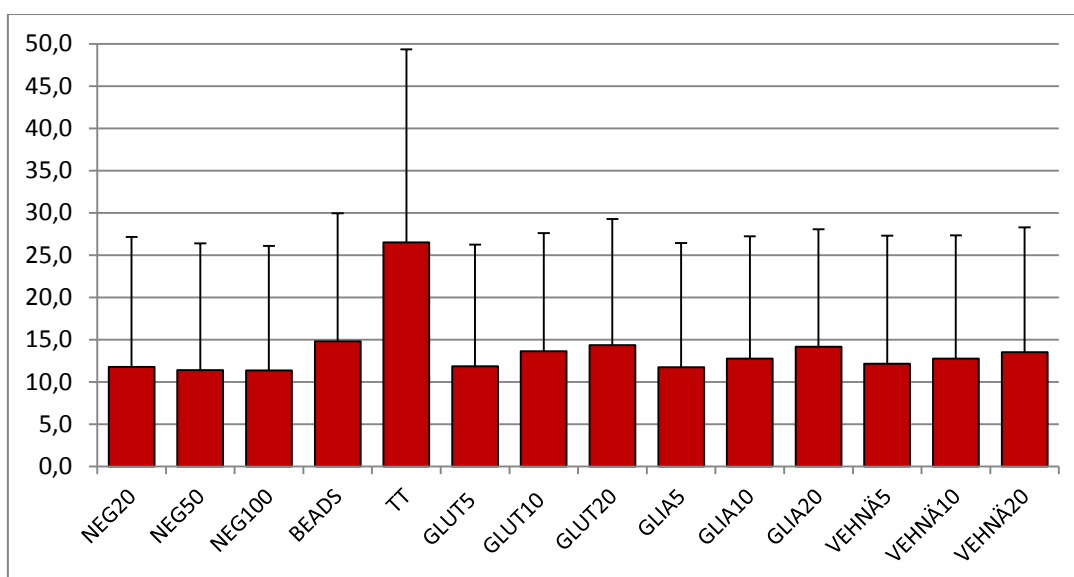
4. Pipetoi ympäröiviin kuoppiin 200 µl PBS:ää, jotta näytekuopat eivät kuivuisi viljelyn aikana. Kasvatus 6vrk +37 °C:ssa

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<b>A</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	<b>i</b>	<b>j</b>	<b>k</b>	<b>l</b>
<b>B</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	<b>i</b>	<b>j</b>	<b>k</b>	<b>l</b>
<b>C</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	<b>i</b>	<b>j</b>	<b>k</b>	<b>l</b>
<b>D</b>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>
<b>E</b>	<b>m</b>	<b>n</b>	<b>o</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>r</b>	<i>PBS</i>					
<b>F</b>	<b>m</b>	<b>n</b>	<b>o</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>r</b>	<i>PBS</i>					
<b>G</b>	<b>m</b>	<b>n</b>	<b>o</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>r</b>	<i>PBS</i>					
<b>H</b>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>PBS</i>					

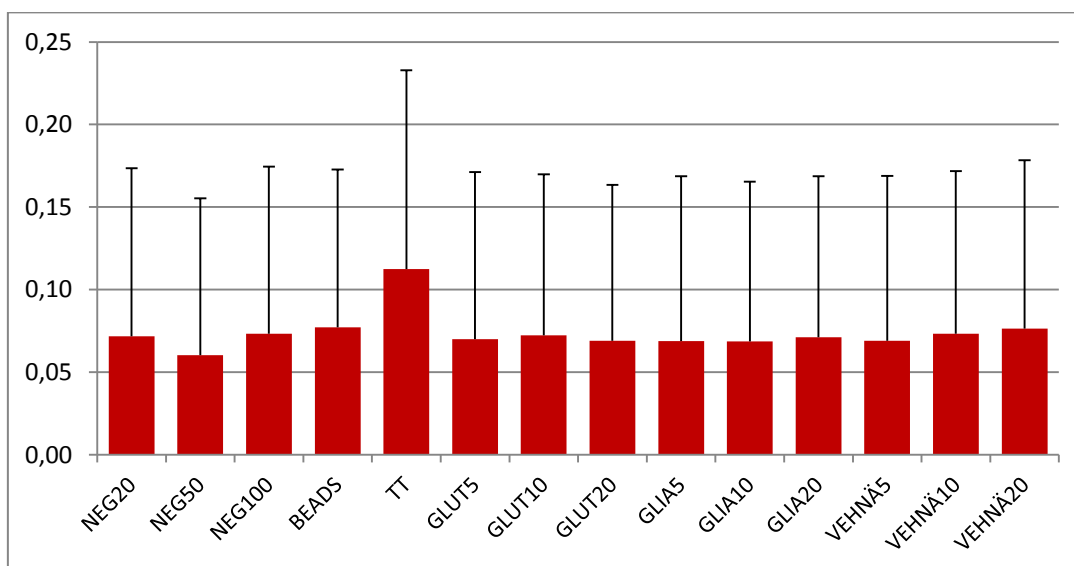
## **Proliferaation mitta**

Tee väricocktail: näytekupin määrä (+ pari pipetointivaraa) x 4 µl CD4-PE leimaa + näytekupin määrä x 46 µl FACS -puskuria.

1. Siirrä solut kupista 96- V-kupin levyille. Pipetoi vastapainolevyille vettä tms. vastaaviin kuppiin.
2. Sentrifugoi 1650 rpm 2 min + 10 °C
3. Kaada supernatantit pois ja resuspendoi solut 100 µl:aan FACS -puskuria
4. Sentrifugoi 1650 rpm 2 min + 10 °C
5. Pipetoi 50 µl väricocktailia jokaiseen näytekuppaan ja resuspendoi.
6. Inkuboi levyä 30 min jääkaapissa.
7. Sentrifugoi 1650 rpm 2 min + 10 °C
8. Kaada supernatantit pois ja resuspendoi solut 100 µl:aan FACS -puskuria
9. Toista kohdat 7 ja 8. Varo ilmakuplia resuspendoidessa.
10. Mittaus FACS Arialla. Mittausta varten näytteet siirretään polystyreeniputkiin. Näytteet on suojattava valolta esim. foliolla ja pidettävä jäissä ennen mittausta.

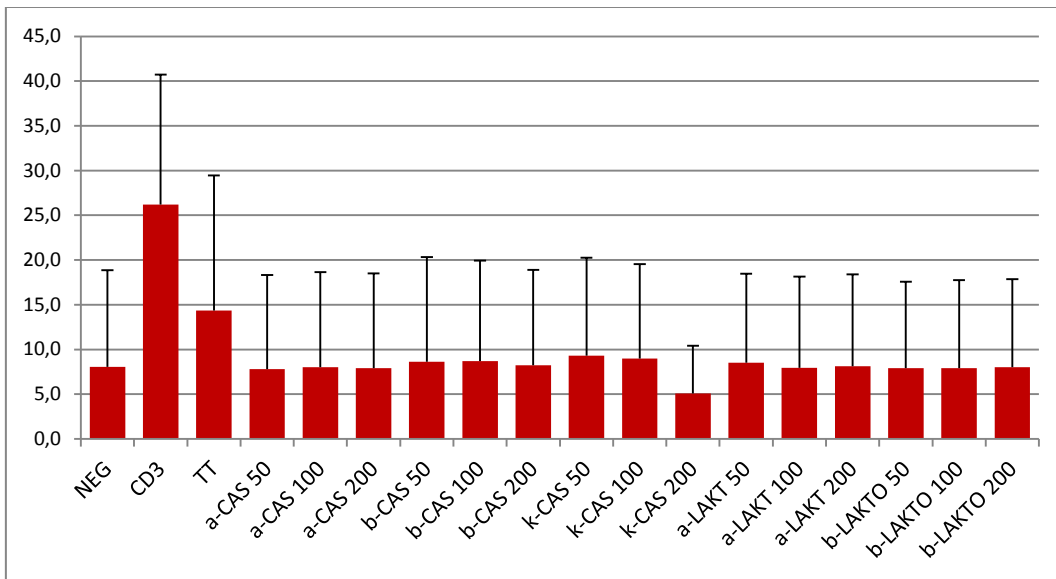


*Vehnän CGM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*

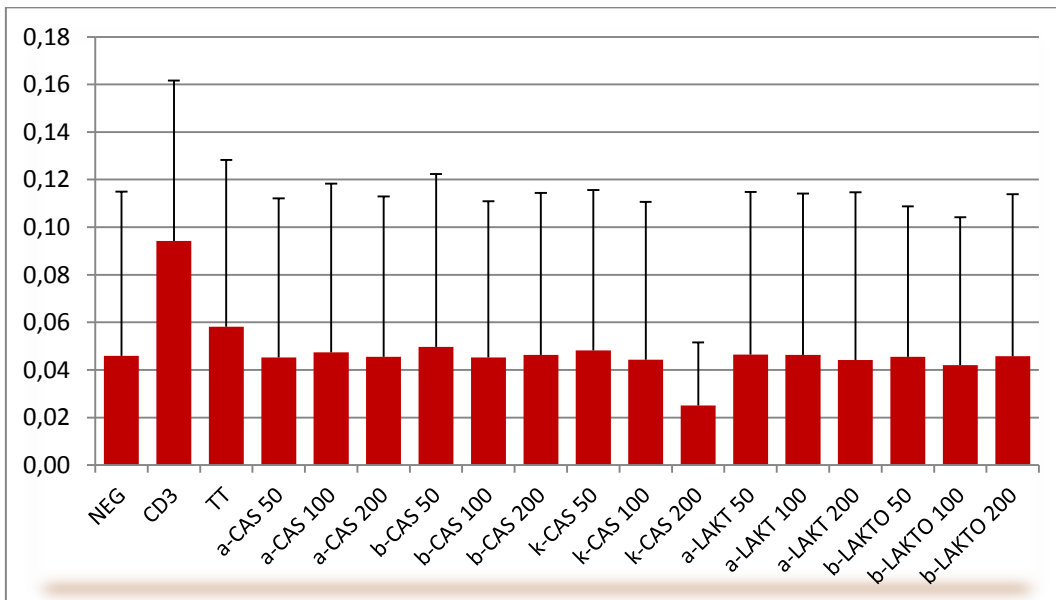


*Vehnän DIM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*

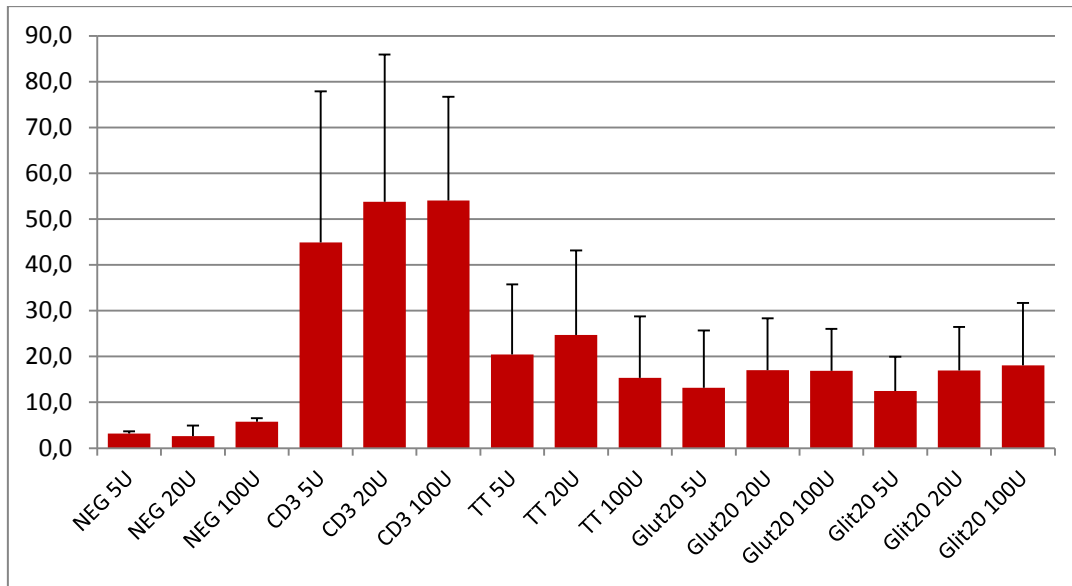




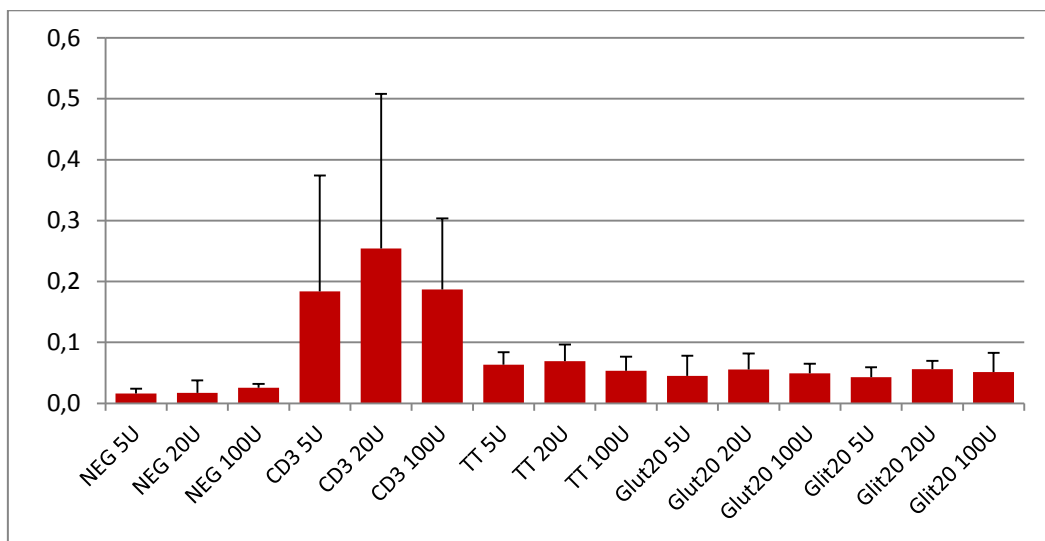
*Maidon CGM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*



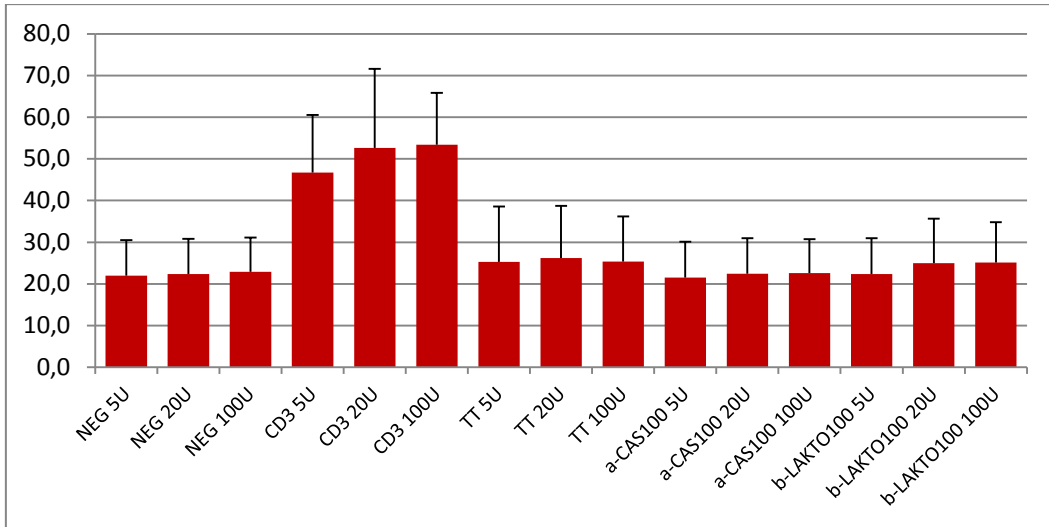
*Maidon DIM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*



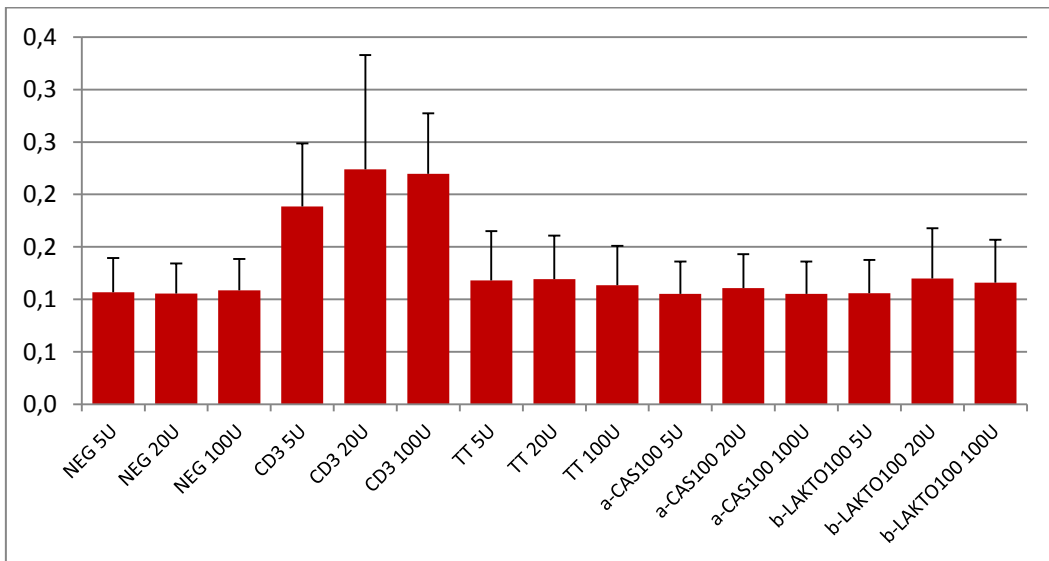
*Vehnän IL2-CGM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*



*Vehnän IL2-DIM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*



*Maidon IL2-CGM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla on kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselilla asteikko kuvaa prosentteina solujen jakaantumista.*



*Maidon IL2-DIM-kuvaaja. Kuvaajan x-akselilla kontrollit ja antigeenit eri pitoisuuksineen ja y-akselin asteikko kuvaa koko solupopulaation jakautumista sisältäen myös jakaantumattomat solut.*

Vehnän yhteenvetotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Taulukossa vasemman puoleisimmassa sarakkeessa olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa.

Sample	NEG 20		NEG 50		NEG 100		Beads		Tetanus		Gluten 5		Gluten 10		Gluten 20		Gliadin 5		Gliadin 10		Gliadin 20		Wheat 5		Wheat 10		Wheat 20	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM
1	3,030	0,037	2,903	0,023	3,020	0,026	4,980	0,016	3,930	0,015	2,980	0,011	3,720	0,030	7,077	0,036	3,290	0,024	2,615	0,033	7,105	0,037	3,990	0,018	3,413	0,049	4,797	0,037
2	1,723	0,023	1,233	0,017	1,623	0,026	1,480	0,020	16,367	0,056	2,980	0,020	11,067	0,032	7,920	0,020	1,413	0,009	5,080	0,013	7,430	0,022	1,785	0,007	2,863	0,017	5,403	0,030
3	37,400	0,214	36,600	0,150	35,900	0,215	36,900	0,216	48,450	0,295	35,500	0,210	35,300	0,212	35,267	0,210	35,467	0,204	34,967	0,200	35,067	0,201	36,333	0,209	35,800	0,202	37,050	0,223
4	43,033	0,304	41,467	0,301	41,150	0,303	42,250	0,289	44,400	0,280	40,850	0,300	41,850	0,291	47,200	0,277	41,867	0,297	43,200	0,291	43,850	0,298	43,800	0,295	42,700	0,299	44,100	0,307
6	10,800	0,029	11,233	0,027	11,233	0,029	11,900	0,032	14,133	0,038	11,850	0,036	15,600	0,045	12,033	0,035	11,700	0,037	12,067	0,040	11,500	0,036	11,100	0,029	11,067	0,030	13,167	0,037
7	9,710	0,050	9,517	0,049	9,477	0,060	10,100	0,069	74,167	0,281	11,395	0,062	12,687	0,056	15,067	0,050	10,353	0,064	12,713	0,057	13,633	0,051	9,590	0,064	14,000	0,073	11,400	0,042
8	4,760	0,023	4,710	0,016	4,577	0,021	5,123	0,023	6,817	0,030	4,227	0,026	5,017	0,026	5,150	0,022	4,403	0,023	4,377	0,024	5,987	0,027	4,727	0,028	7,353	0,040	6,930	0,039
9	1,890	0,022	2,043	0,013	2,237	0,035	2,880	0,026	12,003	0,036	2,883	0,024	4,610	0,019	6,700	0,028	3,927	0,013	5,100	0,014	6,583	0,019	4,163	0,022	4,153	0,019	3,857	0,030
11	1,673	0,008	1,203	0,006	0,986	0,013	4,573	0,018	12,333	0,024	0,935	0,003	1,053	0,002	0,967	0,001	1,133	0,003	1,357	0,005	1,036	0,004	1,300	0,015	1,235	0,002	1,463	0,010
12	3,780	0,007	3,153	0,001	3,335	0,004	27,967	0,064	32,667	0,070	5,070	0,008	5,643	0,009	6,363	0,011	3,980	0,012	6,283	0,010	9,647	0,018	4,880	0,004	4,973	0,004	7,050	0,008
Average	11,780	0,072	11,406	0,060	11,354	0,073	14,815	0,077	26,527	0,112	11,867	0,070	13,655	0,072	14,374	0,069	11,753	0,069	12,776	0,069	14,184	0,071	12,167	0,069	12,756	0,073	13,522	0,076
Stdev	15,382	0,102	14,991	0,095	14,753	0,101	15,129	0,096	22,793	0,120	14,382	0,101	13,956	0,097	14,918	0,094	14,675	0,100	14,465	0,097	13,896	0,098	15,121	0,100	14,582	0,098	14,755	0,102

Vehnän yhteenvetotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Jokaisesta mittaustuloksesta on vähennetty sitä vastaava negatiivinen arvo.

Taulukossa vasemman puoleisimmassa sarakkeessa olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa

Sample	NEG 20		NEG 50		NEG 100		Beads		Tetanus		Gluten 5		Gluten 10		Gluten 20		Gliadin 5		Gliadin 10		Gliadin 20		Wheat 5		Wheat 10		Wheat 20	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM
TP01	0,000	0,000					1,950	-0,022	0,900	-0,022	-0,050	-0,027	0,690	-0,007	4,047	-0,002	0,260	-0,014	-0,415	-0,004	4,075	0,000	0,960	-0,020	0,383	0,011	1,767	0,000
TP02	0,000	0,000					-0,243	-0,003	14,643	0,032	1,257	-0,004	9,343	0,009	6,197	-0,003	-0,310	-0,014	3,357	-0,010	5,707	-0,002	0,062	-0,017	1,140	-0,006	3,680	0,007
TP03	0,000	0,000					-0,500	0,002	11,050	0,081	-1,900	-0,004	-2,100	-0,002	-2,133	-0,004	-1,933	-0,010	-2,433	-0,014	-2,333	-0,013	-1,067	-0,005	-1,600	-0,012	-0,350	0,009
TP04	0,000	0,000					-0,783	-0,016	1,367	-0,024	-2,183	-0,004	-1,183	-0,014	4,167	-0,027	-1,167	-0,007	0,167	-0,014	0,817	-0,006	0,767	-0,009	-0,333	-0,005	1,067	0,003
TP06	0,000	0,000					1,100	0,004	3,333	0,010	1,050	0,008	4,800	0,017	1,233	0,007	0,900	0,009	1,267	0,012	0,700	0,007	0,300	0,001	0,267	0,001	2,367	0,009
TP07	0,000	0,000					0,390	0,019	64,457	0,231	1,685	0,012	2,977	0,007	5,357	0,001	0,643	0,015	3,003	0,007	3,923	0,001	-0,120	0,014	4,290	0,023	1,690	-0,008
TP08	0,000	0,000					0,363	0,000	2,057	0,007	-0,533	0,002	0,257	0,003	0,390	-0,002	-0,357	0,000	-0,383	0,001	1,227	0,003	-0,033	0,005	2,593	0,017	2,170	0,016
TP09	0,000	0,000					0,990	0,003	10,113	0,014	0,993	0,002	2,720	-0,003	4,810	0,006	2,037	-0,009	3,210	-0,009	4,693	-0,003	2,273	0,000	2,263	-0,003	1,967	0,008
TP11	0,000	0,000					2,900	0,010	10,660	0,016	-0,738	-0,005	-0,620	-0,006	-0,706	-0,007	-0,540	-0,005	-0,316	-0,003	-0,637	-0,004	-0,373	0,007	-0,438	-0,006	-0,210	0,002
TP12	0,000	0,000					24,187	0,057	28,887	0,063	1,290	0,001	1,863	0,002	2,583	0,004	0,200	0,005	2,503	0,003	5,867	0,011	1,100	-0,003	1,193	-0,003	3,270	0,001
Average	0,000	0,000	#####	#####	#####	#####	3,035	0,005	14,747	0,041	0,087	-0,002	1,875	0,000	2,594	-0,003	-0,027	-0,003	0,996	-0,003	2,404	-0,001	0,387	-0,003	0,976	0,002	1,742	0,005
Stdev	0,000	0,000	#####	#####	#####	#####	7,516	0,021	19,393	0,075	1,387	0,010	3,361	0,009	2,790	0,010	1,110	0,010	1,970	0,009	2,823	0,007	0,930	0,011	1,717	0,011	1,306	0,006

Maidon yhteenvertotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Jokaisesta mittaustuloksesta on vähennetty sitä vastaava negatiivinen arvo.

Taulukossa ylimmällä rivillä olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa.

	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		CGM		DIM	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	Average	StDev	Average	StDev
NEG	0,11	0,00	0,62	0,00	3,79	0,01	8,56	0,04	34,50	0,23	17,20	0,07	10,90	0,07	1,15	0,00	1,47	0,02	2,38	0,02	8,07	10,81	0,05	0,07
CD3	19,60	0,05	50,20	0,13	6,64	0,02	9,39	0,03	38,90	0,25	41,80	0,14	26,70	0,13	32,00	0,09	23,80	0,06	12,80	0,05	26,18	14,56	0,09	0,07
TT	0,52	0,00	22,33	0,05	10,60	0,04	7,06	0,03	49,87	0,24	25,80	0,10	15,57	0,08	1,35	0,01	4,94	0,02	5,44	0,02	14,35	15,10	0,06	0,07
a-CAS 50	0,21	0,00	0,44	0,00	3,50	0,01	7,01	0,03	33,83	0,22	16,70	0,07	10,47	0,06	1,45	0,00	1,95	0,01	2,35	0,04	7,79	10,54	0,05	0,07
a-CAS 100	0,26	0,00	0,69	0,00	4,26	0,01	6,88	0,03	34,53	0,24	16,83	0,07	10,09	0,07	1,80	0,01	1,82	0,01	3,09	0,04	8,03	10,62	0,05	0,07
a-CAS 200	0,14	0,00	0,26	0,00	3,86	0,02	7,10	0,03	34,10	0,22	17,10	0,08	10,14	0,06	1,92	0,00	2,11	0,01	2,44	0,03	7,92	10,60	0,05	0,07
b-CAS 50	0,19	0,00	0,35	0,00	3,87	0,01	7,54	0,03	38,33	0,24	17,07	0,08	11,13	0,07	2,65	0,02	2,33	0,01	2,94	0,03	8,64	11,70	0,05	0,07
b-CAS 100	0,10	0,00	1,56	0,00	6,33	0,02	6,95	0,03	37,37	0,22	16,57	0,08	10,49	0,07	1,97	0,00	2,47	0,01	3,07	0,03	8,69	11,24	0,05	0,07
b-CAS 200	0,10	0,00	1,81	0,00	4,61	0,02	7,03	0,03	35,07	0,23	16,43	0,08	10,42	0,06	1,76	0,01	1,81	0,01	3,15	0,03	8,22	10,66	0,05	0,07
k-CAS 50	0,34	0,00	9,13	0,02	4,72	0,01	7,14	0,03	36,70	0,23	17,53	0,07	10,80	0,07	1,37	0,01	2,27	0,01	2,89	0,03	9,29	10,95	0,05	0,07
k-CAS 100	0,32	0,00	1,38	0,00	15,19	0,02	6,89	0,03	33,25	0,22	17,33	0,07	10,70	0,06	0,00	0,00	1,93	0,01	2,90	0,04	8,99	10,57	0,04	0,07
k-CAS 200	0,52	0,00	3,58	0,01	5,16	0,02	7,15	0,03	0,00	0,00	17,13	0,07	10,23	0,06	0,00	0,00	3,00	0,02	4,17	0,05	5,09	5,33	0,03	0,03
a-LAKT 50	0,12	0,00	2,27	0,00	4,12	0,01	7,88	0,03	33,00	0,23	17,17	0,08	10,90	0,06	3,18	0,01	2,99	0,01	3,44	0,03	8,51	9,97	0,05	0,07
a-LAKT 100	0,13	0,00	1,55	0,00	3,88	0,01	7,23	0,03	33,53	0,23	15,80	0,07	10,29	0,06	1,88	0,01	2,80	0,01	2,39	0,04	7,95	10,19	0,05	0,07
a-LAKT 200	0,02	0,00	1,69	0,00	3,90	0,01	7,37	0,02	33,87	0,23	15,97	0,07	10,73	0,06	2,16	0,00	2,73	0,01	2,84	0,03	8,13	10,27	0,04	0,07
b-LAKTO 50	0,09	0,00	2,10	0,00	3,70	0,01	7,26	0,03	31,97	0,21	15,57	0,07	10,57	0,07	1,69	0,02	3,07	0,01	3,08	0,04	7,91	9,68	0,05	0,06
b-LAKTO 100	0,08	0,00	1,85	0,00	3,84	0,01	6,77	0,03	32,67	0,21	15,57	0,07	10,18	0,06	1,65	0,01	2,98	0,01	3,45	0,02	7,90	9,87	0,04	0,06
b-LAKTO 200	0,10	0,00	1,52	0,00	4,27	0,01	7,34	0,03	32,63	0,23	15,53	0,07	10,43	0,06	1,78	0,01	2,94	0,01	3,59	0,03	8,01	9,84	0,05	0,07

Maidon yhteenvedotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Jokaisesta mittaustuloksesta on vähennetty sitä vastaava negatiivinen arvo.

Taulukossa ylimmällä rivillä olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa.

	11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		CGM		DIM			
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	Average	StDev	Average	StDev		
NEG	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
CD3	19,49	0,05	49,58	0,13	2,85	0,01	0,83	0,00	4,40	0,02	24,60	0,07	15,80	0,05	30,85	0,09	22,33	0,04	10,42	0,03	18,12	14,90	0,05	0,04	0,05	0,04
TT	0,41	0,00	21,71	0,05	6,81	0,02	-1,50	0,00	15,37	0,01	8,60	0,03	4,67	0,01	0,20	0,01	3,47	0,00	3,06	0,00	6,28	7,29	0,01	0,02	0,01	0,02
a-CAS 50	0,10	0,00	-0,19	0,00	-0,29	0,00	-1,55	-0,01	-0,67	-0,01	-0,50	0,00	-0,43	-0,01	0,30	0,00	0,48	0,00	-0,03	0,01	-0,28	0,58	0,00	0,01	0,00	0,01
a-CAS 100	0,15	0,00	0,07	0,00	0,47	0,00	-1,68	-0,01	0,03	0,01	-0,37	0,00	-0,81	-0,01	0,65	0,01	0,35	-0,01	0,71	0,01	-0,04	0,74	0,00	0,01	0,00	0,01
a-CAS 200	0,04	0,00	-0,36	0,00	0,07	0,00	-1,46	-0,01	-0,40	-0,01	-0,10	0,01	-0,76	-0,01	0,77	0,00	0,64	-0,01	0,06	0,01	-0,15	0,65	0,00	0,01	0,00	0,01
b-CAS 50	0,08	0,00	-0,27	0,00	0,08	0,00	-1,02	-0,01	3,83	0,02	-0,13	0,01	0,23	0,00	1,50	0,02	0,86	-0,01	0,56	0,01	0,57	1,33	0,00	0,01	0,00	0,01
b-CAS 100	-0,01	0,00	0,94	0,00	2,54	0,01	-1,61	-0,01	2,87	-0,01	-0,63	0,01	-0,41	-0,01	0,82	0,00	1,00	-0,01	0,69	0,01	0,62	1,38	0,00	0,01	0,00	0,01
b-CAS 200	-0,01	0,00	1,18	0,00	0,82	0,00	-1,53	0,00	0,57	0,00	-0,77	0,01	-0,48	-0,01	0,61	0,01	0,34	-0,01	0,77	0,01	0,15	0,84	0,00	0,01	0,00	0,01
k-CAS 50	0,24	0,00	8,51	0,02	0,93	0,00	-1,42	-0,01	2,20	0,00	0,33	0,00	-0,10	0,00	0,22	0,01	0,80	-0,01	0,51	0,01	1,22	2,71	0,00	0,01	0,00	0,01
k-CAS 100	0,22	0,00	0,75	0,00	11,40	0,00	-1,67	-0,01	-1,25	-0,01	0,13	0,00	-0,20	-0,01	-1,15	0,00	0,46	-0,01	0,52	0,01	0,92	3,77	0,00	0,01	0,00	0,01
k-CAS 200	0,41	0,00	2,96	0,01	1,37	0,01	-1,41	-0,01	-34,50	-0,23	-0,07	0,01	-0,67	-0,01	-1,15	0,00	1,53	0,00	1,79	0,02	-2,97	11,17	-0,02	0,07	-0,02	0,07
a-LAKT 50	0,01	0,00	1,64	0,00	0,33	0,00	-0,68	-0,01	-1,50	0,00	-0,03	0,01	0,00	-0,01	2,03	0,01	1,52	-0,01	1,06	0,01	0,44	1,11	0,00	0,01	0,00	0,01
a-LAKT 100	0,03	0,00	0,93	0,00	0,09	0,00	-1,33	0,00	-0,97	0,00	-1,40	0,00	-0,61	-0,01	0,73	0,01	1,33	-0,01	0,01	0,01	-0,12	0,95	0,00	0,01	0,00	0,01
a-LAKT 200	-0,09	0,00	1,07	0,00	0,11	0,00	-1,19	-0,01	-0,63	0,00	-1,23	0,00	-0,17	-0,01	1,01	0,00	1,26	-0,01	0,46	0,00	0,06	0,90	0,00	0,01	0,00	0,01
b-LAKTO 50	-0,02	0,00	1,47	0,00	-0,09	0,00	-1,30	0,00	-2,53	-0,02	-1,63	0,00	-0,33	0,00	0,54	0,02	1,60	-0,01	0,70	0,01	-0,16	1,34	0,00	0,01	0,00	0,01
b-LAKTO 100	-0,03	0,00	1,22	0,00	0,05	0,00	-1,79	-0,01	-1,83	-0,02	-1,63	0,00	-0,72	-0,01	0,50	0,01	1,51	-0,01	1,07	0,00	-0,16	1,27	0,00	0,01	0,00	0,01
b-LAKTO 200	-0,01	0,00	0,90	0,00	0,48	0,00	-1,22	0,00	-1,87	0,00	-1,67	0,00	-0,47	-0,01	0,63	0,01	1,47	-0,01	1,21	0,01	-0,05	1,20	0,00	0,01	0,00	0,01

Vehnän IL2- yhteenvetotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Taulukossa ylimmällä rivillä olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa

IL-2 Vehnä	2C		11C		12C		CGM		DIM	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	Average	Sdev	Average	Sdev
NEG 5U	3,50	0,01	3,44	0,02	2,60	0,01	3,18	0,50	0,02	0,01
NEG 20U	0,00	0,00	4,07	0,04	3,82	0,01	2,63	2,28	0,02	0,02
NEG 100U	6,68	0,03	5,31	0,03	5,41	0,02	5,80	0,77	0,03	0,01
CD3 5U	9,67	0,03	49,80	0,13	75,13	0,40	44,87	33,01	0,18	0,19
CD3 20U	18,75	0,05	60,67	0,17	81,87	0,54	53,76	32,12	0,25	0,25
CD3 100U	29,00	0,07	60,43	0,19	72,80	0,30	54,08	22,58	0,19	0,12
TT 5U	22,70	0,06	4,16	0,05	34,53	0,09	20,46	15,31	0,06	0,02
TT 20U	29,43	0,07	4,42	0,04	40,35	0,10	24,73	18,42	0,07	0,03
TT 100U	10,69	0,04	4,91	0,05	30,47	0,08	15,36	13,40	0,05	0,02
Glut20 5U	27,60	0,08	5,71	0,03	6,31	0,02	13,21	12,47	0,05	0,03
Glut20 20U	27,40	0,08	4,98	0,03	18,70	0,05	17,03	11,30	0,06	0,03
Glut20 100U	16,53	0,05	7,93	0,03	26,17	0,07	16,88	9,12	0,05	0,02
Glit20 5U	20,60	0,06	5,86	0,04	11,06	0,03	12,51	7,48	0,04	0,02
Glit20 20U	22,03	0,07	6,03	0,04	22,80	0,06	16,95	9,47	0,06	0,01
Glit20 100U	12,90	0,03	7,83	0,03	33,50	0,09	18,08	13,60	0,05	0,03



Vehnän IL2- yhteenvetotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Jokaisesta mittaustuloksesta on vähennetty sitä vastaava negatiivinen arvo.

Taulukossa ylimmällä rivillä olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa.

IL-2 Vehnä	2C		11C		12C		CGM		DIM	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	Average	Sdev	Average	Sdev
NEG 5U	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
NEG 20U	0,00	0,00	0,00	-0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,02
NEG 100U	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD3 5U	6,18	0,01	46,36	0,00	72,53	0,39	41,69	33,42	0,13	0,22
CD3 20U	18,75	0,05	56,59	0,01	78,05	0,53	51,13	30,02	0,20	0,29
CD3 100U	22,32	0,04	55,13	0,04	67,39	0,29	48,28	23,30	0,12	0,14
TT 5U	19,20	0,04	0,72	0,03	31,93	0,08	17,28	15,70	0,05	0,02
TT 20U	29,43	0,07	0,35	0,03	36,53	0,08	22,10	19,17	0,06	0,03
TT 100U	4,01	0,01	-0,39	0,01	25,05	0,06	9,56	13,60	0,03	0,03
Glut20 5U	24,10	0,07	2,27	0,06	3,71	0,01	10,03	12,21	0,05	0,03
Glut20 20U	27,40	0,08	0,91	0,04	14,88	0,04	14,40	13,25	0,06	0,02
Glut20 100U	9,85	0,02	2,62	0,02	20,75	0,05	11,08	9,13	0,03	0,02
Glit20 5U	17,10	0,05	2,42	0,04	8,46	0,02	9,33	7,38	0,04	0,01
Glit20 20U	22,03	0,07	1,96	0,03	18,98	0,05	14,32	10,82	0,05	0,02
Glit20 100U	6,22	0,00	2,52	0,01	28,09	0,07	12,28	13,82	0,03	0,04

Maidon IL2- yhteenvetotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Taulukossa ylimmällä rivillä olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa

IL-2 maito	11D		12D		13D		14D		CGM		DIM	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	Average	Sdev	Average	Sdev
NEG 5U	25,20	0,13	32,27	0,14	12,80	0,07	17,60	0,09	21,97	8,56	0,11	0,03
NEG 20U	24,03	0,12	33,37	0,14	13,83	0,08	18,23	0,09	22,37	8,44	0,11	0,03
NEG 100U	25,73	0,13	33,10	0,14	14,77	0,08	17,90	0,09	22,88	8,23	0,11	0,03
CD3 5U	60,53	0,25	53,13	0,22	44,93	0,17	28,37	0,11	46,74	13,81	0,19	0,06
CD3 20U	73,00	0,36	63,27	0,27	43,20	0,15	31,07	0,12	52,63	18,99	0,22	0,11
CD3 100U	63,37	0,27	57,93	0,25	57,00	0,23	35,23	0,14	53,38	12,42	0,22	0,06
TT 5U	24,40	0,13	44,27	0,18	14,83	0,08	17,53	0,09	25,26	13,30	0,12	0,05
TT 20U	26,30	0,13	43,83	0,17	16,57	0,08	17,97	0,09	26,17	12,54	0,12	0,04
TT 100U	26,77	0,13	40,13	0,16	17,60	0,08	17,03	0,09	25,38	10,80	0,11	0,04
a-CAS100 5U	24,97	0,13	31,97	0,13	12,97	0,07	16,30	0,08	21,55	8,59	0,11	0,03
a-CAS100 20U	26,63	0,14	32,20	0,13	13,60	0,07	17,20	0,09	22,41	8,53	0,11	0,03
a-CAS100 100U	25,53	0,13	32,63	0,13	14,77	0,07	17,57	0,08	22,63	8,08	0,11	0,03
b-LAKTO100 5U	27,80	0,13	31,50	0,13	14,00	0,07	16,30	0,08	22,40	8,56	0,11	0,03
b-LAKTO100 20U	30,27	0,16	37,43	0,17	14,83	0,07	17,43	0,08	24,99	10,69	0,12	0,05
b-LAKTO100 100U	28,55	0,13	37,13	0,17	15,97	0,07	18,73	0,10	25,10	9,67	0,12	0,04

Maidon IL2- yhteenvertotaulukko, jossa rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot ja keskiarvojen keskiarvot sekä keskihajonnat.

Jokaisesta mittaustuloksesta on vähennetty sitä vastaava negatiivinen arvo.

Taulukossa ylimmällä rivillä olevat numerot tarkoittavat tutkimukseen osallistuneen tutkimusnumeroa.

IL-2 maito	11D		12D		13D		14D		CGM		DIM	
	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	CGM	DIM	Average	Sdev	Average	Sdev
NEG 5U	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NEG 20U	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NEG 100U	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CD3 5U	35,33	0,11	20,87	0,09	32,13	0,10	10,77	0,03	24,78	11,21	0,08	0,04
CD3 20U	48,97	0,24	29,90	0,13	29,37	0,07	12,83	0,03	30,27	14,77	0,12	0,09
CD3 100U	37,63	0,14	24,83	0,11	42,23	0,15	17,33	0,05	30,51	11,46	0,11	0,05
TT 5U	-0,80	-0,01	12,00	0,05	2,03	0,00	-0,07	0,00	3,29	5,93	0,01	0,02
TT 20U	2,27	0,01	10,47	0,03	2,73	0,01	-0,27	0,00	3,80	4,64	0,01	0,01
TT 100U	1,03	0,00	7,03	0,02	2,83	0,00	-0,87	0,00	2,51	3,37	0,00	0,01
a-CAS100 5U	-0,23	0,00	-0,30	0,00	0,17	0,00	-1,30	0,00	-0,42	0,62	0,00	0,00
a-CAS100 20U	2,60	0,02	-1,17	0,00	-0,23	0,00	-1,03	0,01	0,04	1,75	0,00	0,01
a-CAS100 100U	-0,20	0,00	-0,47	-0,01	0,00	-0,01	-0,33	0,00	-0,25	0,20	0,00	0,00
b-LAKTO100 5U	2,60	0,00	-0,77	0,00	1,20	0,00	-1,30	0,00	0,43	1,80	0,00	0,00
b-LAKTO100 20U	6,23	0,03	4,07	0,03	1,00	0,00	-0,80	0,00	2,63	3,13	0,01	0,02
b-LAKTO100 100U	2,82	0,00	4,03	0,03	1,20	-0,01	0,83	0,01	2,22	1,48	0,01	0,01