

Opinnäytetyö (AMK)

Bio-ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Ida Koho

# POHJUSTAVAT TYÖT HIIRIMALLIN TH2- SOLUTUTKIMUKSEEN UUDELLA POISTOGEENISELLÄ HIIRIKANNALLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

Turun ammattikorkeakoulu

Bio-ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

24.5.2012 | 42

Ilari Suominen, Yliopettaja

Sanna Edelman, Tutkijatohtori

Ida Koho

## POHJUSTAVAT TYÖT HIIRIMALLIN TH2-SOLUTUTKIMUKSEEN UUDELLA POISTOGEENISELLÄ HIIRIKANNALLA

Th2-solut ohjaavat immuunivastetta allergiseen immuunipuolustukseen. Niihin T-lymfosyytit voivat erilaistua erilaisiksi toiminnallisiksi immuunivasteen soluiksi ja Th2-soluksi polarisoitumisen aikaansaa pääasiassa interleukiini 4. Th2-solun erilaistumista sääteleviä transkriptiotekijöitä ovat STAT6, GATA3 ja NFIL3. STAT6:n ja GATA3:n toimintamekanismit tunnetaan jo paremmin kuin NFIL3:n. NFIL3:n roolin tärkeydestä immuunipuolustukseen yleensä on jo saatu varmuus, sillä se on ratkaiseva proteiini esimerkiksi NK-solujen kehittämisessä.

Tämän Th2-solututkimuksen tarkoituksena on ymmärtää NFIL3:n rooli Th2-solun polarisaatiossa tutkien transgeenisia *Nfil3*<sup>-/-</sup> hiiriä ja se toteutetaan tarkkailemalla soluja, proteiiniuotantoa, sytokiiniuotantoa ja geenien ilmentymistä. Opinnäytetyöni kuitenkin rajoittuu tämän tutkimuksen alkuvaiheisiin, sillä tutkimusmateriaalin eli tutkimushiirien määrää on toistaiseksi riittämätön. Poistogeenisten hiirien vertailuparina käytettiin normaaleja villikannan soluja ja Th2-solujen vertailuparina käytettiin Th0- tai Th1-soluja. Th-solujen toimintamekanismien, erilaistumisen ja niiden takana toimivan solusignaali- ja sytokiini- ja kemotaktiikan tutkiminen auttaa ymmärtämään ihmisen ja eläinten immuunisysteemin toimintaa ja mahdollistaa terapeuttisten sovellusten kehittämistä. Tämä opinnäytetyö käsittelee tutkimustyön alkuvaiheiden haasteita ja niiden ratkaisemista.

Tutkimuksen alkuvaiheeseen liittyy paljon sopivien metodien kartoittamista ja niiden optimointia. Silloin tällöin uuden asian löytäminen saattaa johtaa tutkimuksen suunnan muutokseen. Tässä tutkimuksessa tutkimusmateriaalina käytettävien poistogeenisten hiirien luultiin alunperin olevan genotyypiltään *Nfil3*<sup>-/-</sup>, mutta alkuperäisillä siitoshiirillä onkin ollut sekä poistogeenialleeli että villityypialleeli. Tämä johti hiirikannan genotyypin määrittämiseen ja uuden risteytys suunnitelman tekemiseen hiirillä, joiden genotyypit ovat *Nfil3*<sup>-/-</sup>, *Nfil3*<sup>+/-</sup> ja *Nfil3*<sup>+/+</sup>. Muita tutkimuksen kohteita olivat solujen erilaistumisolosuhteiden optimointi ja NFIL3 proteiinin ekspressiokinetiikka. Tärkeimpiä tutkimuksessa käytettäviä metodeja olivat PCR, agarosigeelielektroforeesi, intrasellulaarinen sytokiinin värjäys ja virtausytometria sekä western blot.

ASIASANAT: NFIL3, Th2-solut, polarisoituminen, poistogeeniset hiiret, sytokiini, astma

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Bio- and food technology | Biotechnology

24.5.2012 | 42

Ilari Suominen, Principal lecturer

Sanna Edelman, Postdoctoral fellow

Ida Koho

## PREPARATORY WORK FOR TH2 CELL DIFFERENTIATION PROJECT WITH A NEW KNOCK OUT MOUSE POPULATION

Th2-cells have a role in asthmatic immune response. Naïve T lymphocytes are capable of differentiating into various effector cells and interleukin 4 is the main polarizing cytokine for Th2-cells. Major transcription factors that regulate Th2 polarization are STAT6, GATA3 and NFIL3. NFIL3 regulation mechanisms of STAT6 and GATA3 are better known than of NFIL3. Generally NFIL3 is considered as an important protein in immune system, as it has been observed essential driving the development of NK-cell.

The goal of this research is to understand the role of NFIL3 in Th2-cell polarization by observing the difference between *Nfil3* knock out mice and wild type mice. The measurements are determined at cell, at protein and at RNA level. In this thesis particularly it is focused on preparatory work of the investigation because of low amount of mice. Th0- and Th1-cells were used as reference for Th2-cells. Investigation of Th-cell differentiation and activation and the pathway behind that increases our understanding of human and animal immunosystem and enables the developing of therapeutic applications. This thesis deals with the facts that need to be taken into account when starting a new research.

At the beginning of the research suitable methods must be found and optimized. One might come across with problems or unexpected twists that might make research to aim to another direction. Mice used in this research were thought to be *Nfil3*<sup>-/-</sup> genotype but it was found that the original breeding pair were heterozygotes for *Nfil3*. This led to genotyping and planning of new breeding plan with the population of *Nfil3*<sup>-/-</sup>, *Nfil3*<sup>+/-</sup> and *Nfil3*<sup>+/+</sup> -mice. Other aims in the beginning of the research were optimizations of polarization conditions and screening for NFIL3 expression kinetics. Main methods used in the research were PCR, gelagaroseelectroforesis, western blot, intracellular staining of cytokines and flow cytometry.

KEYWORDS:

NFIL3, Th2-cells, polarization, transgenic mouse, cytokine, asthma

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>1 TUTKIMUKSEN TAUSTAA</b>	<b>9</b>
1.1 Immuunisysteemi ja Th2- solut	9
1.2 NFIL3 transkriptitekijä	11
1.3 Sytokiinit ja solun erikoistuminen	12
<b>2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIAALIT JA METODIT</b>	<b>15</b>
3.1 Tutkimushiiret	15
3.2 Hiirestä eristettyjen naiivien solujen kasvatus Th-soluiksi	16
3.2.1 Solujen eristys	16
3.2.2 Solujen kasvatusolosuhteet	17
3.2.3 Solueristys sekä anti-CD28 ja anti-CD3 aktivaatio	18
3.3 Virtaussytometria	19
3.3.1 Virtaussytometrian periaate	19
3.3.2 Sytokiinien värjäys	21
3.3.3 Intraselulaarinen NFIL3:n värjäys	25
3.3.4 Western blot	25
3.3.5 PCR ja agarosigeelielektroforeesi	26
<b>4 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT</b>	<b>29</b>
4.1 Solujen kasvatus	29
4.1.1 Anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuuden optimointi	30
4.1.2 Solujen eristysmetodi	32
4.2 Hiiripopulaation genotyypit	34
4.3 NFIL3 ekspressiokinetiikka	35
<b>5 LOPUKSI</b>	<b>36</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>38</b>

## LIITTEET

Liite 1. *Nfil3*-poistogeenisen hiiripopulaation genotyypit  
 Liite 2. Uudet siitosparit

## KUVAT

Kuva 2.1.1 Th1- ja Th2-solujen erilaistuminen	11
Kuva 2.3.1 Solujen aktivointi sytokiinien tuotantoon	14
Kuva 4.1 <i>Nfil3</i> -geenideleetio	17
Kuva 4.4.1 Virtaussytometrian periaatekuva	21
Kuva 4.4.2 FACS:n pistekuvaaja verensolupopulaatioista	21
Kuva 4.4.3 <i>Nfil3</i> -deleetion vaikutus Th2 solun IL-4 -tuotantoon	22
Kuva 4.4.4 <i>Nfil3</i> -deleetion vaikutus Th2 solun IL-10 -tuotantoon	23
Kuva 4.4.5. Kasvatus II:n pistekuvaaja IL-4:n ja IL10:n tuotannosta päivänä 5	24
Kuva 4.4.6. Kasvatus II:n pistekuvaaja IL-3:n ja IL5:n tuotannosta päivänä 5	24
Kuva 3.2.2 36:n yksilön PCR-tuotokset käyttäen WTF ja WTR alukkeita	29
Kuva 3.2.3 36:n yksilön PCR-tuotokset käyttäen WTF ja KOR alukkeita	29
Kuva 5.1.1 Kasvatus ja puhdistus olosuhteiden vertailu	30
Kuva 5.1.2 Solueristykseen sekä anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuuden optimointi	31
Kuva 5.1.3 CD4+ CD62L+ CD44low solut	32
Kuva 5.1.4 Tiheyskuvaaja FACS-lajiteltujen solujen puhtaudesta	33

Kuva 4.3.1 NFIL3 ekspressiokinetiikka	35
---------------------------------------	----

## TAULUKOT

Taulukko 3. Aikaisempien julkaisujen tulokset NFIL3:n vaikutuksesta sytokiinituotantoon	15
Taulukko 4.4.2.1 FACS:n pistekuvaaja verensolupopulaatioista	23
Taulukko 3.2.1 PCR:ssä monistuvien bandien emäsparipituudet	28

## KÄYTETYT LYHENTEET

APC	Antigen presenting cell
APC	Allophycocyanin, fluorosomi
CD4	Cluster of differentiation 4, leukosyyttien pinta markkeri
CD62L	L-selektiini, pintamarkkeri
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GATA3	GATA binding protein 3, Th2-solujen erikoistumiseen vaikuttava transkriptiotekijä
FITC	Fluorescein isothiocyanate, fluorosomi
HRP	Horseradish Peroxidase, piparijuuri peroksidaasi
IFN $\gamma$	Interferoni gamma, Th1 suuntaan polarisoiva sytokiini
IL(-4)	Interleukiini (-4, Th2 suuntaan polarisoiva sytokiini)
KO	Knock out, poistogeeninen
MHCII	Major histocompatibility complex, pintareseptori
NFIL3	Nuclear factor IL-3, Transkriptiotekijä
Nfil3 <sup>-/-</sup>	Genotyypiltään <i>Nfil3</i> -poistogeeninen

NK	Natural killer cell, luonnollinen tappajasolu
PAR	Proline- and acide rich proteins, proliinirikkaat ja hapokkaat proteiinit
PBS	Phosphate buffered saline
PE	R-phycoerythrin, fluorosomi
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate, solujen aktivointiin käytetty aine
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4, Th1-solujen erikoistumiseen vaikuttava transkriptiotekijä
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, Th2-solujen erikoistumiseen vaikuttava transkriptiotekijä
T-bet	T-box transcriptor factor, Th1-solujen erikoistumiseen vaikuttava transkriptiotekijä
Th-solu	T-helper cell, T-auttajasolu
Thp	aktivoimaton/erilaistumaton Th-solu
TBE	Tris borate EDTA -puskuri
TBS	Tris buffered saline
WT	Wild type, villi tyyppi

## JOHDANTO

T-auttajasolujen kommunikointi tapahtuu erilaisten signaalimolekyylien kuten sytokiinien ja pintareseptorien avulla. Usein niiden takana on pitkä ketju (engl. pathway) tapahtumia, jotka vaikuttavat tietyn geenin ja sitä kautta syntyvän viestintämolekyylin ilmentymiseen. Turun Biotekniikan Keskuksessa, Riitta Lahesmaan molekyyli-immunologian tutkimusryhmässä on pitkään tutkittu CD4+ T-solujen eli Th-solujen (T-auttajasolu, engl. T helper cell) aktivoitumista, erilaistumista ja eri tekijöiden vaikutusta niiden toimintaan sekä niiden yhteyttä allergia- ja tulehdusreaktioihin sekä muihin autoimmuunisairauksiin.

Eliön immuunipuolustus alkaa kun APC-solut (engl. antigen-presenting cell) aktivoivat T-lymfosyytit esittelemillään antigeeneilla. Naiivi erilaistumaton T-solu tunnistaa antigeenin reseptoreillaan ja alkaa kehittyä antigeenin aiheuttaman signaalin ansiosta esimerkiksi Th0-, Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Th22- (Annunziato ja Romagnani 2009) tai Treg-soluksi (Bettelli 2006). Yksilölle tasapaino erilaisten lymfosyyttien välillä on tärkeää terveyden kannalta. Jos tasapaino poikkeaa normaalista, immuunipuolustus häiriintyy, mikä saattaa johtaa autoimmuunisairauteen. Lymfosyyttien erilaistumista ja siihen vaikuttavia tekijöitä tutkimalla saadaan lisää tietoa autoimmuunisairauksista.

Th2-solut ovat allergeenispesifisiä soluja ja niihin liittyviä sairauksia ovat esim. allergiat, atopia, Omenn syndrooma ja idiopaattinen keuhkofibroosi (Romagnani, 1999). NFIL3 on transkriptiotekijä, eli proteiini, joka sitoutuu geenin promoottorialueeseen ja säätelee transkriptiota. Se on GATA3:n ja STAT6:n ohella yksi tärkeä transkriptiotekijä Th2-solujen erikoistumisessa. Tutkimustuloksia on julkaistu NFIL3:n vaikutuksesta vuorokausirytmiiin ja NK-solujen (engl. NK-cell, natural killer cell) kehittymiseen, mutta sen tarkkaa roolia Th2-solujen erikoistumisessa ei vielä tunneta (Male ym., 2011).

Tutkimuksessa käytettiin hiiren pernasta eristettyjä CD4+CD62L+ soluja eli naiveja Th-soluja. *In vitro* kasvatetut solut erilaistuvat esim. Th2-soluiksi kohdatessaan tietyt sytokiinit. Polarisoituneiden eli erilaistuneiden solujen



sytokiiniekspressiota tutkittiin ja verrattiin *Nfil3* -knock out hiiristä eristettyjen solujen sytokiini tuotantoon. Välillä eroa villityypin solujen ja knock out solujen sytokiini tuotannossa huomattiin eroavaisuuksia ja välillä ei. Tuloksista pääteltiin, että tutkimushiirien genotyypissä on oltava eroja. Hiirien genotyypit määritettiin ja ymmärrettiin, että alkuperäiset siitosparit olivat *Nfil3*-poistogeenin suhteen heterotsygootteja, ja tämän hetkisen hiiripopulaation hiiret ovat genotyypiltään *Nfil3*<sup>-/-</sup>, *Nfil3*<sup>+/-</sup> ja *Nfil3*<sup>+/+</sup>. Hiirille suunniteltiin uudet siitosparit ja *Nfil3*<sup>-/-</sup>-hiirien syntymistä odotellaan. Toistaiseksi hiiripopulaatio on liian pieni tutkimuksen jatkamiseksi, mutta tutkimuksen aloitukseen vaadittavat kasvatuksen ja muiden metodien optimoinnit on tehty ja tutkimusmateriaalin kartuttua tutkimusta päästään jatkamaan heti.

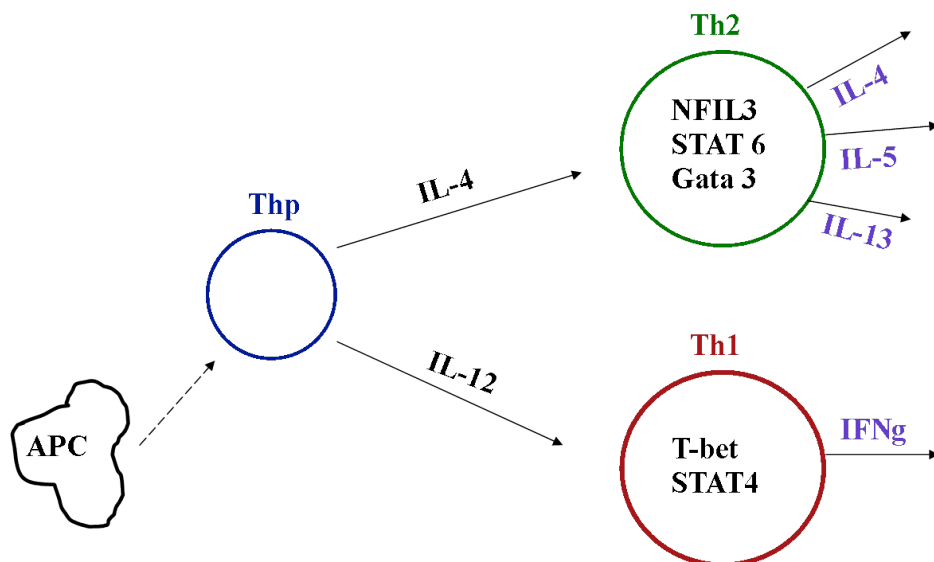
## 1 TUTKIMUKSEN TAUSTAA

### 1.1 Immuunisysteemi ja Th2- solut

Lymfosyytit takaavat immuunivasteen perustan. Niitä ovat B-solut ja kahteen ryhmään jakautuvat T-solut; Tc-solut (sytotoksiset T-solut, engl. cytotoxic T cells) ja Th-solut (T-auttajasolut, engl. helper T cells) sekä NK-solut (engl. Natural killer cell tai large granular lymphocyte, LGL, luonnolliset tappajasolut) (Roitt, ym. 1998). Lymfosyyteillä on kaikilla omat tehtävänsä. B-solut valmistavat vasta-aineita Th-solujen vapauttamien sytokiinien avustamana, Tc-solut ja NK-solut tappavat infektoituneita soluja. Th-solut auttavat muita immuunivasteen soluja erilaistumaan tai valmistautumaan hyökkäykseen antigeeniä vastaan solu-solu välisellä interaktiolla. Th0 on tutkimustarkoitukseen käytetty olosuhde, jonka kasvatuksessa polarisoivat sytokiinit jätetään pois. Naiivi Th-solu ei erilaistu Th0-soluksi luonnollisissa olosuhteissa. Naiiveja T-lymfosyyttejä on yleensä verenkierrossa, imusolmukkeissa tai pernassa ja erikoistuttuaan ne siirtyvät muihin kudoksiin. (Roitt ym., 1998)

CD4+ Th-solut ovat immuunipuolustusta organisoivia soluja. Ne saavat alkunsa luuytimen kantasoluista mutta ne kuljetetaan erilaistumaan kateenkorvaan. Solujen pinnassa on erilaisia pintareseptoreita solutyypistä riippuen. T-solut tunnistaa esimerkiksi CD4:stä (engl. cluster of differentiation 4) ja MHC II pintareseptorista ja naivit T-solut CD62L:stä (L-selektiini reseptori) CD44<sup>High</sup> -solut taas ovat muisti-efektori soluja. Pintareseptorit ovat solujen kommunikointivälineitä. Esimerkiksi MHC reseptorit vastaanottavat tietoa läsnäolevista antigeeneistä. (Roitt ym., 1998)

Th-solut kommunikoivat keskenään erilaisten reseptorien ja sytokiinien avulla. Kullekin solutyypille on olemassa niille ominaiset reseptorit ja niin ne on käytännössä mahdollista erottaa toisistaan erilaisilla leimausmetodeilla. Th2-solut tuottavat IL-4, IL-5, IL-9 ja IL-13 -sytokiineja, joilla ne ohjaavat immuunipuolustusta. Th2-sytokiinit esimerkiksi aktivoivat B-soluja tai vasta-aine-antigeeni komplekseja fagosytoivia eosinofiilejä.



Kuva 2.1.1 Th1- ja Th2-solujen erilaistuminen. Kaavakuvassa on esitetty tärkeimmät Th1- ja Th2 solujen erikoistumiseen vaikuttavat transkriptiotekijät (solun sisällä) ja sytokiinit.

## 1.2 NFIL3 transkriptiotekijä

DNA:han sitoutuvat geenien ilmentymistä säätelevät transkriptiotekijät kontrolloivat sytokiinituotantoa ja näin ollen vaikuttavat myös T-solujen erikoistumiseen. Th2-solujen tärkein polarisoiva sytokiini on IL-4 ja Th1-solujen IL-12 ja IFN $\gamma$  (Romagnani S., 1999). IL-4 säätelee mm. transkriptiotekijä STAT6:n ekspressiota, joka taas vaikuttaa nostattavasti IL-4:n tuotantoon (engl. feed back loop). Transkriptiotekijä GATA3 tehostaa IL-4:n, IL-5:n ja IL-13:n tuottoa ja inhiboi IFN $\gamma$ :n tuottoa. (Rautajoki, 2007)

GATA3:n ja STAT6:n ohella yksi tärkeä transkriptiotekijä Th2-solujen erikoistumisessa on NFIL3, joka on saanut nimensä transaktivaattorifunktionsa ansiosta. NFIL3 aktivoi IL-3:ta koodittavan geenin promoottorialueen ihmisen T-soluissa (engl. nuclear factor IL-3). Se tunnetaan toisellakin nimellä; E4BP4 (engl. Basic leucine zipper transcription factor), sillä alunperin se todettiin sitoutuvan adenovirus E4:n promoottorialueeseen toimien aktivoivana transkriptiotekijänä. Kyseisellä proteiinilla on todettu olevan vaikutusta nisäkkäiden vuorokausirytmien säätelyyn (Male ym., 2011). Toisaalta se on välttämätön proteiini NK-solujen kehittämisessä (Gascoyne ym., 2009) ja tavattavissa muissa yhteyksissä immuunivasteessa työskentelevien solujen kuten dendriittisolujen tuotannossa. NFIL3 osallistuu myös solun sytokiinituotannon säätelyyn ja Th2-solun efektorimuodon erilaistumiseen (Male ym., 2011).

NFIL3 kuuluu rakenteensa perusteella PAR-perheen proteiinien (engl. proline- and acide rich proteins) ryhmään (Cowell, 2002). Se myös sitoutuu samankaltaiseen DNA sekvenssiin kuin PAR-perheen proteiinit (Kashiwada ym. 2011). NFIL3:n ilmentyminen on vähäistä monissa immuunipuolustuksen solutyypeissä, mutta Th2-soluissa se indusoituu interleukiini (IL)-4:n läsnäollessa, solun polarisoitumis- eli erikoistumisvaiheessa. NFIL3:ssa on vielä paljon tutkittavaa, mutta tällä hetkellä tiedetään jo monia asioita liittyen rakenteeseen, geenin sijaintiin sekä tehtäviin. NFIL3 toimii monosyyttien, B-solujen, T-solujen ja NK solujen kanssa eli voidaan sanoa, että sillä on tärkeä rooli immuunipuolustuksessa (Male ym. 2011).

### 1.3 Sytokiinit ja solun erikoistuminen

Sytokiinit (kreikaksi cyto -, solu; kinos-, liike) ovat solusta soluväliaineeseen erittyviä proteiineja, jotka ovat kooltaan 8-80 kDa. Soluspesifisten signaalimolekyylien tuotto on tarkkaan säädely. Ihmisen sytokiineja on identifioitu satoja monenlaisten tieteenedustajien toimesta, joten niillä on erilaisia nimityksiäkin esimerkiksi interferonit, interleukiinit ja kasvutekijät. Sytokiinien tehtävä on signalin välittäminen ja sen vaikutuksen kohteita voivat olla: solun erilaistuminen, vasta-aineiden tuoton aktivointi, verihitaleiden erittyminen tai esim. osteoklastien eli luun syöjäsolujen muodostuminen ja säätely. (Roitt ym., 1998)

T-solujen erikoistumisvaiheessa tiedetään erittyvän ainakin 20 erilaista sytokiiniä. (Rickwood ym., 1995) Interleukiini (IL) 2 on T-solujen tärkein sytokiini, ja kaikille T-solutyypeille on omat niille tyypilliset sytokiininsa. IL-4, IL-5 ja IL-13 ovat Th2-välitteisiä sytokiineja, joiden geenit ovat sijoittuneena samaan kromosomaaliseen alueeseen nimeltään Th2-sytokiinilokus (Fields, 2004) . Th2-solut tuottavat myös IL-9 ja IL-10 -sytokiineja. Th2-solun sytokiinit edistävät humoraalista immuunipuolustusta eli toimivat kehon nesteissä pääasiassa ekstrasellulaarisia patogeeneja vastaan. IL-4, IL-13 ja IL-9 saavat aikaan B-solujen aktivoinnin. (Tuomela, 2002)

#### **PMA ja ionomysiini -aktivointi**

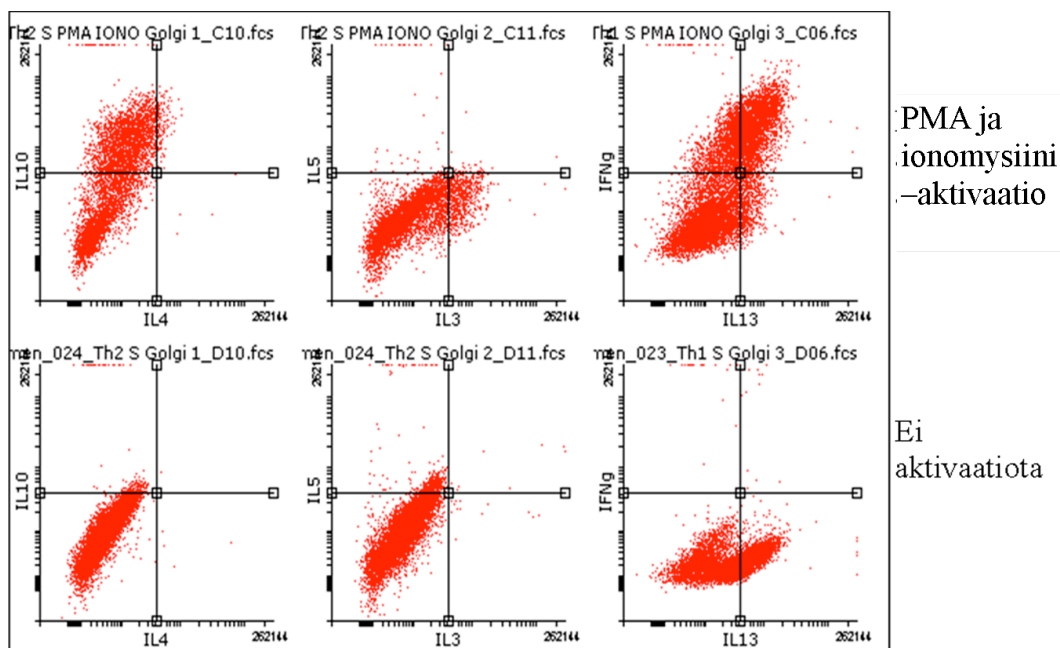
Intrasellulaarista sytokiinien tuottoa voidaan tutkia tekemällä nopea viiden tunnin aktivaatio, jolloin solut alkavat tuottaa tehostetusti sytokiineja (Kuva 2.3.1) jonka jälkeen ne leimataan virtaussytometriamittausta varten (ks. 4.3 Virtaussytometria)

PMA on corton öljystä johdettu biologisesti aktiivinen, karsinogeeninen aine, joka voi aiheuttaa hiirille ihosyöpää. Sen on myös todettu edesauttavan mitoosia ihmisen perifeerisissä veren lymfosyyteissä eli verenkierrossa

kiertävistä B-, T-, ja NK-soluissa. PMA:ta käytetään kun halutaan nopea solujen mitoosin tai sytokiinituotannon aktivointi. (Touraine ym., 1977)

Ionomysiini on ionofori eli solun ionien kuljettaja. Se pystyy siirtämään  $Ca^{2+}$  -ioneja biologisen kalvon läpi. *Streptomyces conglobatussa* tuotettava ionomysiini on kuvattu myös polyeetteriantibiootiksi, joka toimii gram-positiivisia bakteereita vastaan. (Bennet, 1979) Se on laajasti käytetty sytokiinien tuotannon tutkimisessa sen ionoforisten ominaisuuksien ansiosta. Yhdessä PMA:n kanssa solut stimuloidaan tuottamaan sytokiineja.

PMA ja ionomysiini -stimulaation ja inkuboinnin jälkeen sytokiinien erittyminen ulos solusta estetään monensiinillä. Monensiini on *Streptomyces cinnamomensis*:n tuottama ionofori, joka kuljettaa solun tärkeimpiä ioneja  $K^+$ :a ja  $Na^+$ :a. Monensin myös vaikuttaa golgin laitteen toimintaan ja siten estää solun sisäisen proteiini kuljetuksen ja sitä käytetään sytokiinien erittymisen estämiseksi PMA ja ionomysiini -stimuloinnin jälkeen. (Ellinger, 1984)



Kuva 2.3.1 Solujen aktivointi sytokiinien tuotantoon. Pistekuvaajasta voi havaita eron aktivoitujen ja aktivoimattomien solujen sytokiinituotannossa. Yllä PMA ja ionomysiini -aktivoituneet solut ja alla aktivoimattomat solut. Mitatut sytokiinit x-akseleilla ovat IL-3, IL-4 ja IL-13 ja y-akseleilla IL-10, IL-5 ja IFNg

## 2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Transkriptiotekijöiden STAT6 ja GATA3 toimintamekanismit tunnetaan jo paremmin kuin NFIL3:n. Tiedetään, että NFIL3 transkriptiotekijällä on rooli mm. NK- ja Th-soluvälitteisessä immuunipuolustuksessa, mutta sen rooli Th2-solujen sytokiinituotannon säätelyn puitteissa on kuitenkin vielä epäselvä.

Lähiaikoina tähän liittyen on julkaistu kaksi tutkimusta, Kashiwada ym. 2011 ja Motomura ym. 2011, joista ei kuitenkaan vielä voi päätellä NFIL3:n roolia, sillä tulokset ovat ristiriitaiset (Taulukko1). Tutkimuksessa verrattiin tiettyjen Th2-soluille tyypillisten sytokiinien tuottoa kahdenlaisissa Th2 soluissa: villityypin (WT, engl. wild type) ja *Nfil3*<sup>-/-</sup> hiiren soluissa (KO, engl. knock out mouse), joista *Nfil3*-geeni on poistettu. Toisessa tutkimuksessa suurelle osalle sytokiineista havaittiin selkeä ero WT:n ja KO:n välillä ja toisessa todettiin, että NFIL3 on toistaiseksi tuntematon tekijä tärkeimpien Th2-soluvälitteisten sytokiinien ekspressiossa.

Taulukko 1 Aikaisempien julkaisujen tulokset NFIL3:n vaikutuksesta sytokiinituotantoon

Taulukko esittää eri tutkimusten tulokset siitä, sääteleekö NFIL3 sytokiinin tuottoa positiivisesti vai negatiivisesti. Ainoastaan IL-10 tuotannossa tutkimukset ovat yksimielisiä.

	Kashiwada ym.		Motomura ym.
IL-3	Positiivinen		ei eroa
IL-4	Positiivinen		ei eroa
IL-5	Negatiivinen		ei eroa
IL-10	Positiivinen		Positiivinen
IL-13	Negatiivinen		ei eroa

Mistä johtuu kyseinen ero tutkimusten välillä? Aloitimme tutkimuksen, jonka tavoitteena on löytää vastauksia muunmuassa seuraaviin kysymyksiin: Mitkä ovat NFIL3:n säätelymekanismit? Mitkä ovat sen sitoutumiskohdat genomissa?

Pitkällä tähtäimellä kiinnostavia aiheita ovat: NFIL3:n fosforyloituminen ja sen mahdollinen dimeeripartneri.

Tutkimuksessa käytetyt CD4+CD62L+ solut on eristetty hiiren pernasta (ks. kappale 4.1 Tutkimushiiret) ja niitä kasvatettiin seitsemän päivää. Kasvatuksen erilaistumisen optimoinnin jälkeen lähdettiin vertailemaan solujen sytokiinituotantoa, joista voidaan päätellä mm. solun erikoistumisen suunta. Erilaistumisen optimoinnissa vertailuparina käytettiin Th1-soluja.

Tutkimuksessa verrattiin villityypin (WT, engl. wild type) solujen ja *Nfil3*<sup>-/-</sup> poistogeenistenhiirien solujen, sytokiinituotantoa keskenään ja pääteltiin NFIL3:n vaikutukset Th2-solujen erilaistumisessa. Myös NFIL3:n ekspressiokinetiikkaa yritettiin määrittää kahdella eri metodilla käyttäen Th0-olosuhdetta vertailukohteena. Myöhemmin on tarkoitus selvittää miten itse NFIL3-proteiinin tuotantoa säädellään ja miten se itse oikeastaan aktivoituu.

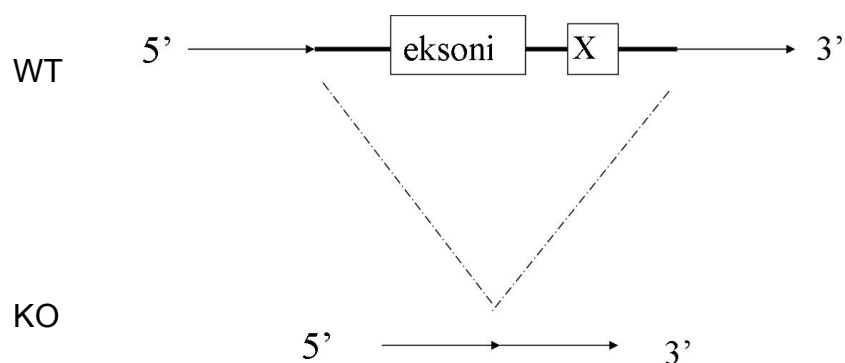
### 3 MATERIAALIT JA METODIT

#### 3.1 Tutkimushiiret

Tutkimusmateriaalina käytettiin Jacksons laboratorion (Yhdysvallat) C57BL/6-hiiriä, joista oli olemassa WT-kannat ja Iso-Britanniassa tehtyt KO-kannat (Gascoyne ym., 2009). KO-kannan genotyyppiä pidettiin lähtökohtaisesti homotsygoottina *Nfil3*<sup>-/-</sup> -kantana, mutta virtausytometrialla tehdyt sytokiinimääritykset antoivat epä johdonmukaisia tuloksia, mikä vuoksi hiirien genotyyppien statuksia ryhdyttiin epäilemään. Hiirten terveydentilasta pyydettiin lisäselvityksiä ja osoittautui, että alkuperäiset toisesta laboratoriosta tilatut risteytysshiiret ovat olleet *Nfil3*-geenin suhteen heterotsygootteja tilattujen homotsygoottien sijaan. Tämänhetkessä 47 hiiren populaatiossa voi olla kolmenlaista alleeliyhdistelmää: *nfil3*<sup>-/-</sup>, *nfil3*<sup>+/-</sup> tai *nfil3*<sup>+/+</sup> ja niiden genotyyppit on määritettävä ennen tutkimuksen aloittamista.

Hiirien tiineysaika on n. 18 päivää. Uros erotetaan naaraasta kun raskaus havaitaan. Hiiret erotetaan emostaan kolmen viikon ikäisenä, jolloin ne

korvamerkitään genotyypausta varten. Sukukypsäksi ne tulevat noin kuuden viikon ikäisenä. Erotus, korvamerkintä ja korvapalojen kerääminen tapahtuu eläinlaboratorion henkilökunnan toimesta. Kaikki hiiret kasvatetaan häkeissä normaalissa huoneenlämmössä. Yksilöiden lukumäärä häkkiä kohden vaihtelee yhdestä seitsemään.



Kuva 4.1 *Nfil3*-geenideleetio

Yläpuolella oleva nauha on WT-DNA nauha ja alapuolella olevasta KO-nauhasta osa on poistettu. Deletoidun *Nfil3*-geenin osan tarkkaa kohtaa (kuvassa tummennettu) ei kerrota geenin poiston tehneen laboratorion julkaisussa. X-kuvaa toisen geenin eksonia. (Gascoyne ym., 2009)

## 3.2 Hiirestä eristettyjen naiivien solujen kasvatus Th-soluiksi

### 3.2.1 Solujen eristys

Solut eristettiin hiiren pernasta. Pernojen murskaamiseen käytettiin kahta metodologia: lasihuhmare ja murskaaminen kahden eri siivilän lävitse. Parempi solususpensio ja sitä kautta solusaanto saatiin lasihuhmaretta käyttäen, joten se valittiin käytettäväksi tutkimuksen seuraaviin kasvatuksiin.

Lymfosyytit erotettiin punasoluista, verihutaleista ja seerumista sokerigradienttieroituksella perustuen sentrifugointiin ja mouse lymphocyte:n



(Cedarlane) tiheysominaisuuksiin. Sen jälkeen solut erotetaan pintareseptoreidensa perusteella. CD4 on T-solujen pintareseptori ja CD62L naiivien T-solujen pintareseptori. Jos CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> -solulla on lisäksi CD44 pintareseptori se on efektori muistisolu (Roitt ym., 1998).

Naiivit T-solut on mahdollista eristää eri tavoilla. Testasimme kahta eri metodia; MACS kittiin (Miltenyi) perustuvaa magneettipylväspuhdistusta ja virtaussyometriaan perustuvaa solulajittelua BD:n FACSaria Ilu Cell Sorting -laitteella (ks. kappale 4.3.1 Virtaussyometria). MACS kittiin kuuluu vasta-aineleimatut magneettihelmet ja magneettiset pylväät. Pylväitä on kaksi, joista ensimmäinen erottaa negatiivisella selektiolla CD4<sup>+</sup> solut ja toinen positiivisella selektiolla CD62L<sup>+</sup> solut. FACS-laitteeseen syötettävät solut leimattiin suoralla leimauksella CD4, CD62L ja CD44 vasta-aineilla, joissa on fluorensioiva konjugaatti. Laite laskee leimatut solut ja erottaa ne leimojen sähköisen varauksen perusteella. FACS-laitteeseen syötetyt solut ovat pylväspuhdistettuja CD4<sup>+</sup> -soluja. Käytetyt vasta-aineet ovat BD Biosciences:n rotassa tuotettuja anti-hiiri vasta-aineita, joissa on fluorensioivat konjugaatit FITC, APC ja PE.

### 3.2.2 Solujen kasvatusolosuhteet

Kasvatusmediaan käytettiin IMDM-mediaa (engl. Iscove's modified Dulbecco's Media, Sigma), johon lisättiin streptomysiiniä 10 µg/ml, penisilliiniä 10 U/ml, (penicillin-streptomycin, Sigma, P0781) L-glutamiinia 0,02 mM (Sigma, G7513), 0,001 mM β-merkaptoetanolia (GIBCO), NEAA, non essential Amino acid (GIBCO) 100X 10µl/1ml ja 10% naudan sikiön seerumia (engl. fetal bovine serum) (PAA laboratories). Solun metabolian myötä kasvatusmedian pH muuttuu ja se voidaan havaita mediaan lisätyn pH indikaattorin fenolipunaisen ansiosta. pH on eläinsolukasvatuksessa tärkeä tekijä ja hyvin voivat solut edellyttävät kasvumediaaltaan n. pH 7-7,3 (S. B. Primrose. 1991).

Naiivien solujen erikoistamiseksi kasvatusmediaan lisättiin polarisoivat/neutralisoivat vasta-aineet, joka Th2:n tapauksessa ovat IL-4/anti-

IL-12, anti-IFN $\gamma$  ja Th1:llä IL-12/anti-IL-4, anti-IFN $\gamma$ . Th0-solulle eli neutraalille kontrolli-Th-solulle annetaan kasvatuksen aloituksessa vain neutralisoivat vasta-aineet anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-12 ja anti-IL-4. Seuraavat vasta-aineet tilattiin R&D Systemsiltä: IL-2 (pitoisuus kasvatuksessa 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ), IL-4 ja IL-12 (pitoisuus kasvatuksessa 0,01 $\mu\text{g/ml}$ ). Muut vasta-aineet olivat BD:n tuotteita, joista neutralisoivien vasta-aineiden pitoisuus kasvatuksessa oli 10  $\mu\text{g/ml}$ . Kaikkiin olosuhteisiin lisätään anti-CD28 ja kaikkien olosuhteiden kasvatuskuopat päällystettiin anti-CD3:lla, TCR-tyypin reseptorilla (engl. T-cell reseptor). Päällystys tehtiin liuottamalla anti-CD3 PBS-puskuriin (engl. phosphate buffered saline) ja inkuboimalla kyseisellä luoiksella täytettyjä kuoppalevyjä +37 °C:ssa tunnin ajan. Anti-CD28 ja anti-CD3 on todettu aktivoivan translaatioon liittyviä proteiineja solun erikoistumisen alkuvaiheessa (Miranda Kleijn ym., 2002). Niiden pitoisuus haluttiin optimoida, jotta varmistetaan, että olosuhteet sopivat hiiren Th2 soluille (ks. Kappale 5.1.1 anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuuden optimointi).

Kasvatukset tehtiin tasapohjaisilla 48- tai 96-kuoppalevyillä riippuen eristettyjen solujen määrästä. Keskimäärin soluja saatiin  $2 \cdot 10^6$  -  $10 \cdot 10^6$ /perna riippuen eristyskerrasta ja pernan koosta. 48-kuoppalevyn kuopassa voidaan kasvattaa  $5 \cdot 10^5$  -  $2 \cdot 10^6$  solua ja 96-kuoppalevyn kuopassa  $2 \cdot 10^5$  -  $5 \cdot 10^5$  solua. Solujen anti-CD3 päällystettyyn kasvualustaansa kiinnittymistä ja aktivaation yhtäaikaistamista edistettiin 2 minuutin sentrifugoinnilla nopeutena 800 rpm (kierrosta minuutissa) .

### 3.2.3 Solueristys sekä anti-CD28 ja anti-CD3 aktivaatio

Tehtiin kasvatus, jossa Th1 ja Th2 soluille tehtiin erilaiset anti-CD28 ja anti-CD3-olosuhteet ja ne eristettiin kahdella eri tavalla. Laboratoriossamme on käytetty kahta eri anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuutta aktivaation ensimmäisenä päivänä. Vasta-aineiden pitoisuuden vaikutusta verrattiin ja sen perusteella päätettiin kumpi vasta-ainepitoisuus saa aikaan hyvän ja tehokkaan Th2-polarisaation. Verrattavat pitoisuudet olivat:

- 1) 1,3 µl/ml anti-CD3 + 0,5µl/ml anti-CD28
- 2) 5µl/ml anti-CD3 + 5µl/ml anti-CD28

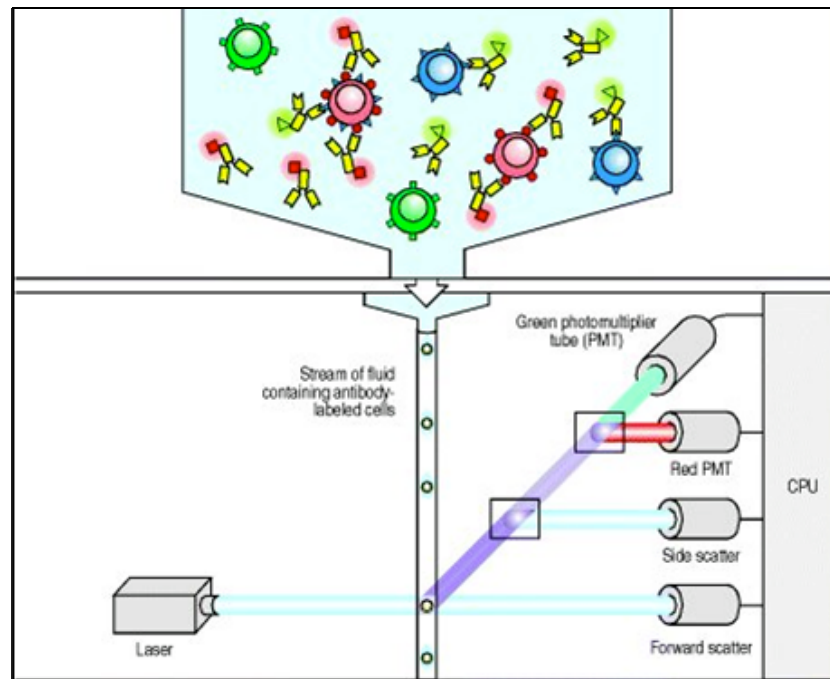
### 3.3 Virtausytometria

#### 3.3.1 Virtausytometrian periaate

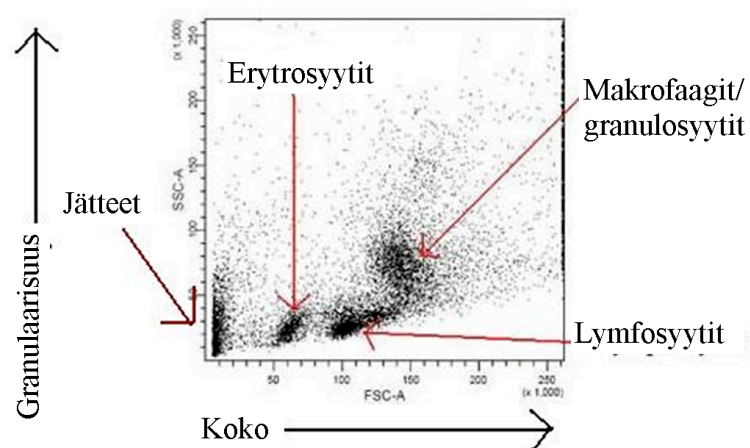
Tutkimuksessa käytetyssä virtausytometrialaitteessa on BD Biosciences:n valmistama FACS-laite (engl. Fluorescence-activated cell sorting), jossa solut kulkevat ohuessa putkessa, johon ne ohjataan tarkasti suunnitellun virtauksen mukaan niin, että ne voidaan detektoida yksitellen. Putkessa ne kohtaavat laservalon säteen, jonka siroamisesta voidaan päätellä solun ominaisuuksia, kuten koko ja granulaarisuus tai detektoida värjättyjä intra- tai ekstrasellulaarisia merkkiproteiineja. Detektorit tuovat tiedon tietokoneelle, joka piirtää yksittäisten solujen perusteella kuvaajan käyttäjän haluamalla tavalla.

Kun laser osuu putkessa kulkevaan soluun, solu estää laserin suoran kulun detektorille muodostaen varjon ja riippuen solun koosta varjo on suurempi tai pienempi. Detektoriin saapuvan valonperusteella voidaan päätellä solun koko (Kuva 4.4.1: forward scatter). Solut ovat ulkomuodoltaan erilaisia (Kuva 4.4.1: side scatter) Esimerkiksi makrofaagit ovat pinnan muodoltaan granulaarisempia ja kooltaan isompia kuin sileät lymfosyytit. Näin molemmat muodostavat ominaisuuksiensa perusteella pistekuvaajassa oman populaationsa ja ne voidaan esimerkiksi valita lajiteltavaksi. Solujen osia kuten pintareseptoreita voidaan myös värjätä fluoresoivilla vasta-aineilla solujen identifioimisen helpottamiseksi. Laserin osuminen fluoresoivaan merkkiaineeseen synnyttää säteitä laitteen optiselle alueelle, jossa detektorit peilien ja valosuodattimien takana keräävät tiedon lähteneen valon aallon pituudesta. FACS-laitetta voidaan käyttää solujen ominaisuuksien tarkasteluun tai solujen konkreettiseen lajitteluun. Lajittelussa (engl. cell sorting) laserilla detektoidut solut kerätään

sähköisen varauksensa perusteella eri putkiin magneettikenttien avulla.  
(Howard M. Shapiro, 2003)



Kuva 4.4.1 Virtaussytometriän periaatekuva. Fluoresenssikonjugoidut vasta-aineet ovat kiinnittyneinä solun pintaan. Solut kulkevat putkea pitkin ja kohtaavat lasersäteen yksitellen. (Janeway ym., 2005)



Kuva 4.4.2 FACS:n pistekuvaaja verensolupopulaatioista. Solupopulaatiot voidaan erottaa kokonsa ja pintaominaisuuksiensa perusteella tietokoneelle

piirrettyssä pistekuvaajassa. Kuva muokattu internetlähteestä Brigham young universityn Research instrumentation core facilityn sivulta [viitattu 10.1.12].

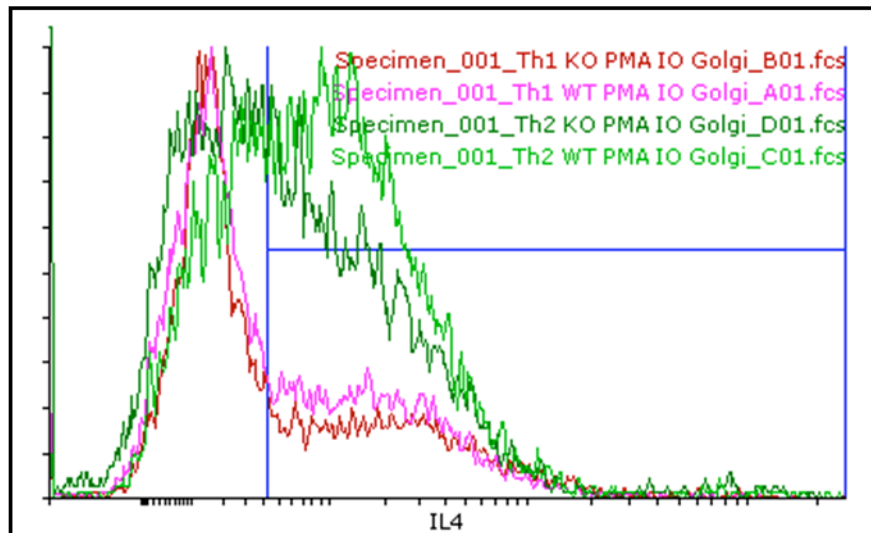
### 3.3.2 Sytokiinien värjäys

Sytokiinien tuottoa seurattaessa tehdään puolelle soluista PMA ja ionomysiini -aktivaatiot (ks. k 2.3 sytokiinit ja solun erikoistuminen). Solut permeabilisoidaan käyttäen BD:n kittiä cytofix/cytoperm™ plus, jonka jälkeen sytokiinit värjätään suoralla leimauksella vasta-aineilla, joilla tietyt fluoresoivat komponenttinsa. FACS-laitteella erilaista aallonpituutta emittoivien fluoresoivien leimausaineiden säteily läpäisee eri suodattimet riippuen aallonpituudesta.

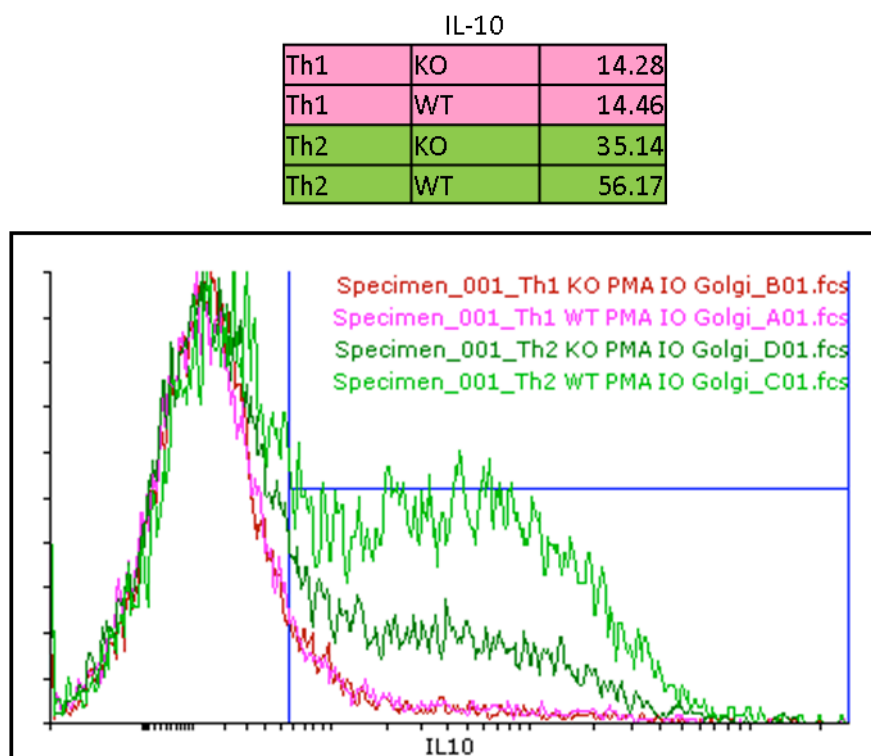
Alussa *Nfil3* KO -hiiret luultiin olevan homotsygootteja *Nfil3*-deleetion suhteen. *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ja IFN $\gamma$  sytokiinien tuottoa verrattiin keskenään. Osassa kasvatuksista *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien sytokiinituotannossa oli eroa (kasvatus I) ja osassa ei (kasvatus II), joten pääteltiin, että KO-hiirten genotyypit vaihtelevat ja ne on määritettävä. (kuvat 4.4.3 - 4.4.6) Tulokset antoivat myös ymmärtää, että geenin deleetiolla on jotain vaikutusta. Koska tutkittujen hiirten genotyypistä ei ole varmuutta, tulokset eivät ole luotettavia. Hypoteesi *Nfil3*:n, vaikutuksesta Th2 solujen erikoistumiseen sai kuitenkin tukea näistä sytokiinimäärityksistä, ja tutkimusta on syytä jatkaa.

## IL-4

Th1	KO	38.3
Th1	WT	39.37
Th2	KO	51.53
Th2	WT	66.39



Kuva 4.4.3 *Nfil3*-delektion vaikutus Th2 solujen IL-4 -tuotantoon (PE). Kasvatuksessa I havaittavissa eroa *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien sytokiinituotannossa. Taulukossa esiintyvät numerot kuvaavat sinisellä portilla rajatun alueen prosenttista osuutta tutkittavasta lymfositopopulaatiosta.



Kuva 4.4.4 *Nfil3*-deletionin vaikutus Th2 solujen IL-10 -tuotantoon (APC). Kasvatuksessa I on havaittavissa eroa *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien sytokiinituotannossa. Taulukossa esiintyvät numerot kuvaavat sinisellä portilla rajatun alueen prosenttista osuutta tutkittavasta lymfosyyttipopulaatiosta.

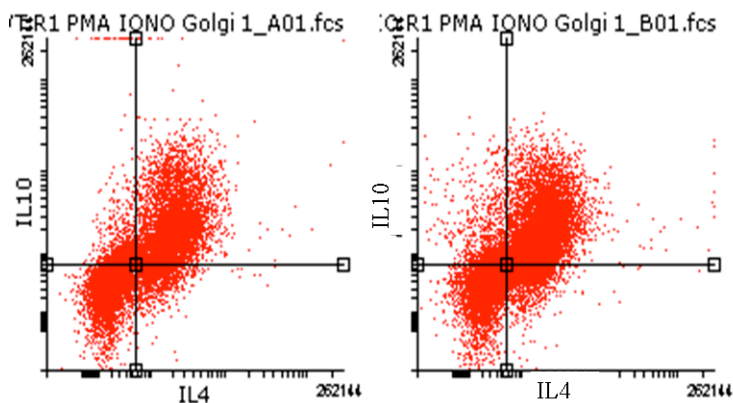
Toisessa myöhemmin tehdyssä kasvatuksessa II, ei nähty eroa *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien sytokiinituotannossa. Pistekuvaaja tehdään kahden muuttujan perusteella. Tapauksessa haluttiin värjätä kuusi eri sytokiinia, joten niistä muokattiin kolme eri värjäysparia niin, että leimausaineet PE, APC tai FITC esiintyvät vain kerran yhdessä kuopassa. (Taulukko 4.4.2.1).

Taulukko 4.4.2.1 FACS:n pistekuvaaja verensolupopulaatioista

Solut värjättiin 96-kuoppalevyllä, jossa jokaiseen kuoppaan laitettiin kaksi eri leimausainetta.

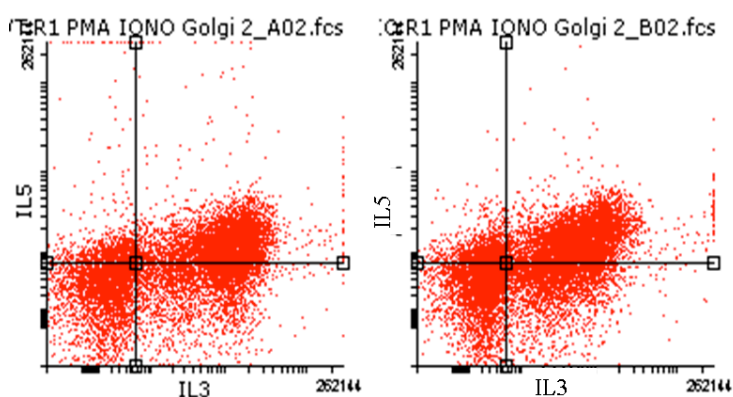
	PE	APC	FITC
--	----	-----	------

1	IL-4	IL-10	
2	IL-3	IL-5	
3		IL-13	IFN $\gamma$



	WT	KO
IL-4	52.12%	55.3%
IL-10	51.9%	53.49%

Kuva 4.4.5. Kasvatus II:n pistekuvaaja IL-4:n ja IL10:n tuotannosta päivänä 5. Kasvatuksessa II ei havaittavissa eroa *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien sytokiinituotannossa. Oikean puolimmainen kuvaaja kuvaa villityyppiä ja vasemmanpuolimmainen *Nfil3* KO:a. Taulukossa esiintyvät numerot kuvaavat prosentista osuutta tutkittavasta lymfosyyttipopulaatiosta.



	WT	KO
IL-13	61.51%	61.73%
IL-5	44.46%	48.6%

Kuva 4.4.6. Kasvatus II:n pistekuvaaja IL-3:n ja IL5:n tuotannosta päivänä 5. Kasvatuksessa II ei havaittavissa merkittävää eroa *Nfil3* KO -hiirien ja WT hiirien sytokiinituotannossa. Oikean puolimmainen kuvaaja kuvaa villityyppiä ja



vasemmanpuolimmainen Nfil3 KO:a. Taulukossa esiintyvät numerot kuvaavat prosentista osuutta tutkittavasta lymfosyyttipopulaatiosta.

### 3.3.3 Intraselulaarinen NFIL3:n värjäys

NFIL3 transkriptiotekijä toimii tumän sisällä eli sitä värjätessä fluoresoivia väriaineita kantavien vasta-aineiden on läpäistävä solukalvon lisäksi tumakalvo. Ensin solut fiksataan eli jähmetetään (engl. fixing) paraformaldehydillä proteiinien stabiloimiseksi. Solut inkuboidaan 4% paraformaldehydissä 10 minuuttia +4 °C:ssa välillä sekoittaen ja näin solut voidaan analysoida vielä vuorokaudenkin kuluttua. (L.L. Lanier, N.L. Warner) Pesujen jälkeen solut permeabilisoidaan lisäten -20°C metanolia ja inkuboiden 30 min +4°C:ssa. NFIL3:n värjämisessä käytetään epäsuoraa leimausta primaarivasta-aineena Santa Cruz Biotechnology:n kanissa hiiren E4BP4 proteiinia vastaan tuotettua ja puhdistettua polyklonaalista IgG:tä (immunoglobuliini G) (Santa Cruz, EBP4 (H-300) Sc-28203) ja sekundaarivasta-aineena Alexa fluor647 -leimattua vuohen anti-kani IgG:tä (Invitrogen A21245). Vasta-aineet inkuboidaan 30-45 minuuttia +4°C:ssa.

### 3.3.4 Western blot

Western blotissa proteiinit erotellaan koon mukaan 10 % SDS-geelillä 30mA:n virralla, jonka jälkeen ne siirretään membraanille 350mA:n virralla 45 minuutissa/geeli. Membraanilta NFIL3 voidaan detektoida sandwich leimauksella fluoresoivaa HRP-detektiota (engl. Horseradish Peroxidase, piparjuuri peroksidaasi) käyttäen. Western blot soveltuu NFIL3 tuotannon kinetiikan määrittämiseen. Western blotia varten kerätyt solunäytteet lysataan keräyspäivänä kuumentamalla ne 5 minuuttia hajotuspuskurissa 95°C :ssa ja sonikoimalla 7 minuuttia. Proteiininäytteet säilötään -20°C:ssa, kunnes kaikkien aikapisteiden näytteet on kerätty. Näytteet laimennetaan SDS-pagea varten 5x värjäyspuskurilla niin, että kaikkiin kuoppiin saadaan sama kokonaisproteiinimäärä. Yleensä tämä määrä on 12-20 mg.

Blokkauspuskurina käytettiin TBS:ää (Tris buffered saline), jossa 0,1% Tweeniä ja 5% maitojauhetta. Sillä estetään vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen membraaniin. Primaarivasta-aineena käytettiin Santa Cruz Biotechnology sc-374451x:a ja se inkuboidaan yön yli +4 °C:ssa liuotettuna blokkauspuskuriin. Konsentraatioon päädyttiin ensin testaamalla 1:1000 ja 1:2000 suhteita, joiden tuloksena oli epäspesifistä vasta-aineen sitoutumista. Lopulliseksi vasta-aine - maito-TBS-tween suhteeksi valittiin 1:5000.

House keeping proteiini on tutkittavalle proteiinille referenssinä käytettävä tunnettu proteiini. NFIL3:lle käytetty house keeping proteiini eli taloudenpito proteiini on  $\beta$ -aktiini (Sigma, hiiressä tuotettu monoklonaalinen vasta-aine A5441). Primaarivasta-aineet inkuboitiiin yön yli +4 °C:ssa ja sekundaarivasta-aine 1h huoneen lämmössä. Sekundaarivasta-aine oli molemmille sama: HRP-konjugoitu vuohessa tuotettu anti-hiiri IgM. HRP entsyymi saadaan fluoresoimaan käyttäen sen substraattia sisältävää detektioreagenssia (Chemiluminescent HRP substrate, Millipore WBKLS0500).

### 3.3.5 PCR ja agarosigeelielektroforeesi

Hiiriä oli lähtötilanteessa 36 ja niiden mahdolliset genotyypit ovat nfil3-geenin suhteen +/+, +/- tai -/-. Hiiriyksilöiden genotyypin määrittämiseen tarvittava DNA eristettiin korvapalasta. Korvapala inkuboitiiin hajoituspuskurissa n. +50°C:ssa yli yön ja seuraavana päivänä tehtiin NaCl-uutto ja etanolisaostus. DNA:ta tuli tällä metodilla vaihtelevasti 1000-2000 ng/korvapala.

PCR:n vaatii primerit eli alukkeet kopioinnin aloittamiseen. Projektissa käytettiin samoja alukkeita, joita on käytetty laboratoriossa, josta hiiret ovat peräisin. Käytetyt alukkeet on suunniteltu niin, että käyttäen joko WT- tai KO alukkeita saadaan erilaiset tulokset eri genotyypeille (ks. kuva 3.2.1). Monistetun DNA-pätkän pituuden perusteella pääteltiin onko tuote KO-DNA:ta vai WT-DNA:ta. Lyhyemmän 238 bp:n pätkän muodostavat WTF-alue 5'-TGAGCTTGGCTGA TGTG-3', ja WTR-alue 5'- GCTTCAAGTCTCCACCAAGC -3'. KO-yksilön näytteestä saadaan detektoitua n. 450 bp:n geeninpätkä käyttämällä WTF ja

KOR, 5' -CCATGCTCCTGTCTTGATGA- 3' -alukkeita (Duncan M Gascoyne, Elane Long ym.)

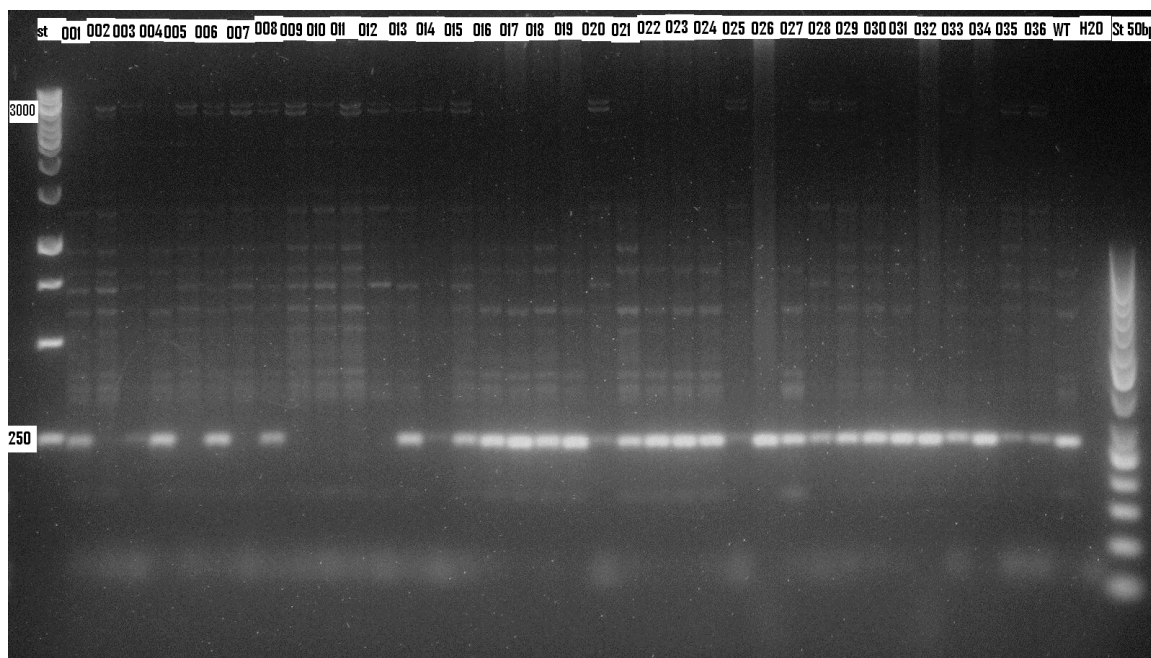
PCR tuotteen visualisoiminen tapahtuu 1,5 % agarosigeelillä, joka erottelee DNA-pätkät koon perusteella. Geeli ajetaan TBE puskurissa (eng. Tris Borate EDTA buffer) 100V:lla ja DNA detektoidaan UV-valossa. Geeli värjätään Nucleic Acid Gel Stain:lla (Lonza) 1:10 000.

Alukkeiden kiinnittymislämpötila piti optimoida ennen koko näytesarjan ajamista. Alukkeet ovat pituudeltaan 20 emäsparia ja niiden valmistajan antama annealing lämpötila oli 57,3-59,4 °C. Optimointilämpötilagradientiksi valittiin 57, 59, 60,3, 61,6, 63 °C ja optimointi-DNA:ksi valittiin kahden genotyypiltään tuntemattoman hiiren 001 ja 002 DNA:ta sekä kahden WT hiiren DNA:ta

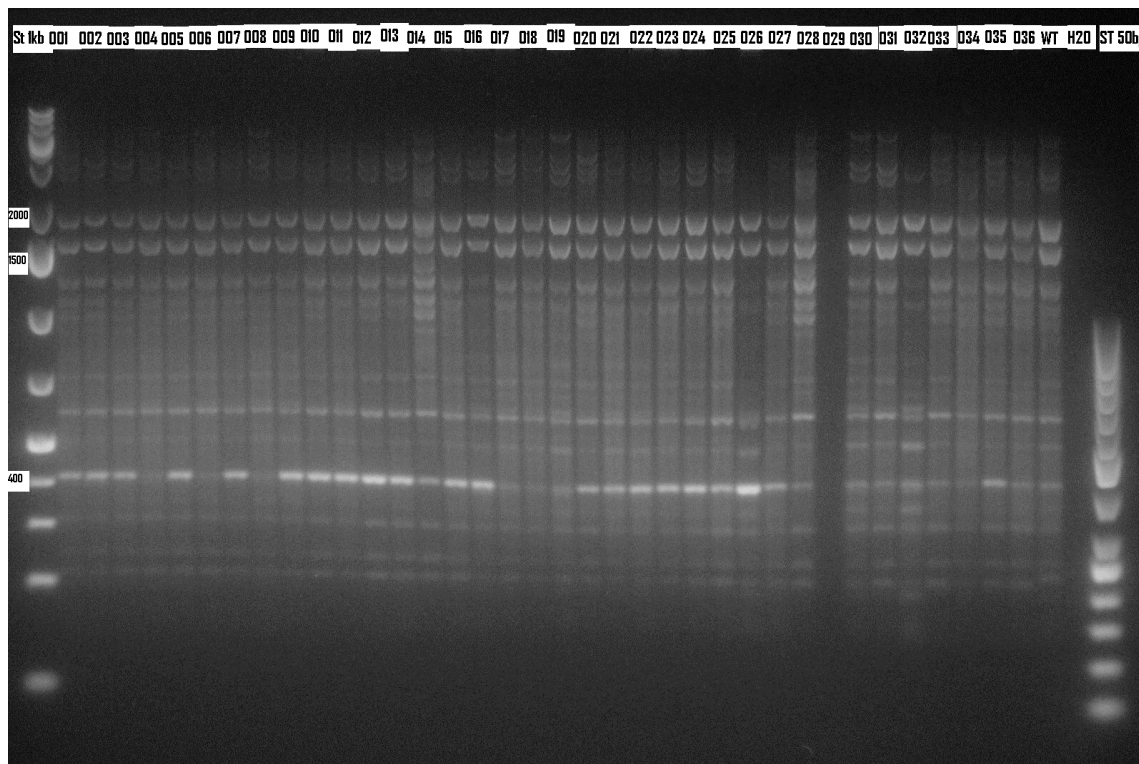
PCR-tuotteet ajettiin agarosielektroforeesigeelillä ja niistä pääteltiin onko monistettu geenin pätkä WT- vai KO- tyyppin geenistä. WT Forward -alukkeen ja WT Reverse -alukkeen etäisyys toisistaan on 238 emäsparia (bp) ja pätkä monistuu vain WT-DNA:ssa, sillä WTR alukkeen pariutumiskohta on alueella, joka KO-geenistä on deletoitu (Kuva 3.2.1). WT:n geenissä, jossa eksoni on tallella WT Forward alukkeen pariutumistaikana ja KO reverse alukkeen pariutumistaikana etäisyys genomissa on 4450 emäsparia ja KO:n geenissä, josta eksoni on deletoitu sama etäisyys on 4450 bp - deleetio  $\approx$  400 emäsparia. Näin geelillä kulkeutuvasta DNA-pätkästä voidaan päätellä onko se WT vai KO. Laboratorio, josta hiiret ovat peräisin, ei kerro deleetion tarkkaa kohtaa. (Gascoyne ym, 2009).

Taulukko 3.2.1 PCR:ssä monistuvien bandien emäsparipituudet. Taulukossa geeliltä visualisoitavien geenin pätkien pituudet emäsparina WT- ja KO-yksilöissä. 4450bp on liian pitkä pätkä monistettavaksi käytetyillä PCR-olosuhteilla.

	WT yksilössä	KO yksilössä
WTF → WTR	238 bp	-
WTF → KOR	4450 bp	4450 bp - deleetio ≈ 450bp



Kuva 3.2.2 36:n yksilön PCR-tuotokset käyttäen WTF ja WTR alukkeita. Bändi 238 bp:n kohdalla tarkoittaa, että yksilöllä on muokkaamaton, WT:n, nfil3 alleeli



Kuva 3.2.3 36:n yksilön PCR-tuotokset käyttäen WTF ja KOR alukkeita. Bändi 400 bp:n kohdalla viittaa KO alleelin läsnäoloon.

## 4 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT

### 4.1 Solujen kasvatus

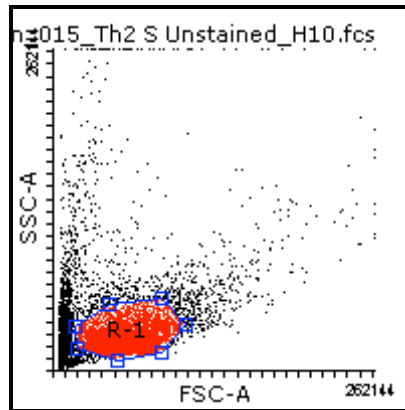
Solujen kasvatuksen aloituksessa vastaan tuli kohtia, johon halusimme etsiä paremman keinon. Yksi niistä oli pernojen murskaaminen. Muovisiivilän käyttö murskaamiseen ei osoittautunut niin tehokkaaksi kuin lasihuhmareen käyttäminen, joten siirryimme käyttämään lasihuhmaretta. Se on myös helppokäyttöisempi aseptisissä olosuhteissa. Vertasimme kahta eri kasvatuksen aktivoinnissa käytettävää anti-CD3:n ja anti-CD28:n pitoisuutta ja tulos oli selkeä. Valitsimme pienemmän pitoisuuden (1,3  $\mu\text{l/ml}$  anti-CD3 + 0,5 $\mu\text{l/ml}$  anti-CD28), sillä tällä valinnalla saamme hyvän Th2-polarisaation. FACS-lajittelu valittiin solujen eristysmetodiksi pylväspuhdistuksen sijaan, sillä

emme tiedä tarkkaan efektori muistisolujen vaikutusta Th1-tai Th2-solujen erikoistumiseen ja pylväspuhdistus ei kykene erottamaan CD44 high soluja kohdesoluistamme. Haluamme, että solut lähtevät erikoistumaan Th1- ja Th2-soluiksi vain naiveista CD4+ CD62L+ CD44low soluista.

#### 4.1.1 Anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuuden optimointi

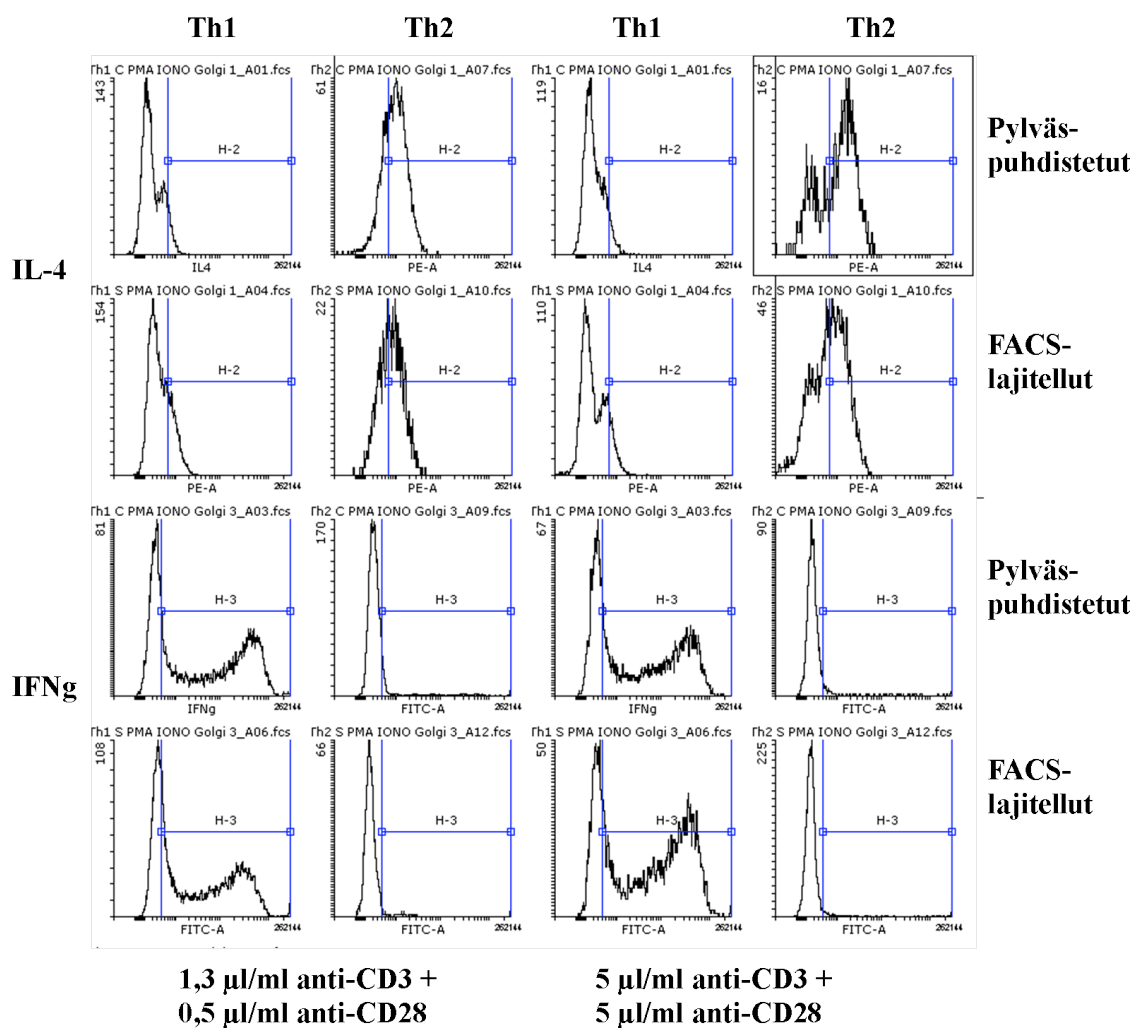
Th-solujen eristämistä ja kasvattamista tehdään rutiinisti Riitta Lahesmaan tytkimuryhmässä, mutta hiirimallille on ollut käytössä kaksi eri anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuutta ja haluttiin määrittää mikä pitoisuus soveltuisi projektiin parhaiten. Yleisesti ottaen korkeampi anti-CD3 ja anti-CD28 -pitoisuus kiihdyttää Th1-solujen sytokiinien tuotantoa kun taas heikommalla anti-CD3 ja anti-CD28 -aktivaatiolla saadaan parempi Th2-solujen erikoistuminen (Taulukko 5.1.1). IL-4:n tuotanto on korkeaa Th2-soluissa ja IFNg:n tuotanto Th1-soluissa. IL-4:n tuotantoa on n. 60%:lla Th2-soluista kun tarkastellaan heikompaa aktivointia eli Th2-solut ovat erilaistuneet toivotusti. Vahvemalla aktivoinilla ei päästä ihan niin korkeisiin lukemiin, sillä vahvempi aktivaatio tukee enemmän Th1-solujen erilaistumista. Myös Th1-solujen polarisaatio näyttää yleisesti ottaen hyvältä, sillä IFNg:n tuotantoa on yli 60% koko populaation soluista. Tutkimukseen valittiin alhaisempi anti-CD3 ja anti-CD28 -pitoisuus eli 1,3 µl/ml anti-CD3 + 0,5µl/ml anti-CD28.

	heikko aktivointi		vahva aktivointi		
	Th1	Th2	Th1	Th2	
IL-4	8.66	66.59	8.07	58.13	Pylväs
	24.14	57.12	13.07	44.54	FACS
IFNg	63.59	10.37	65.28	7.89	Pylväs
	67.87	4.8	74.23	4.01	FACS



Kuva 5.1.1 Kasvatus ja puhdistus olosuhteiden vertailu

Taulukossa on esitetty kuvan 5.1.2 tulokset numeerisina arvoina. Arvot kuvaavat IL-10- tai IFN $\gamma$ -leimattujen solujen prosenttista osuutta koko R-1 solupopulaatiosta. Kuvan 5.1.2 histogrammit perustuvat tähän tutkimusmateriaaliin - seitsemän päivää kasvatettuihin värjäämättömiin Th2-soluihin.



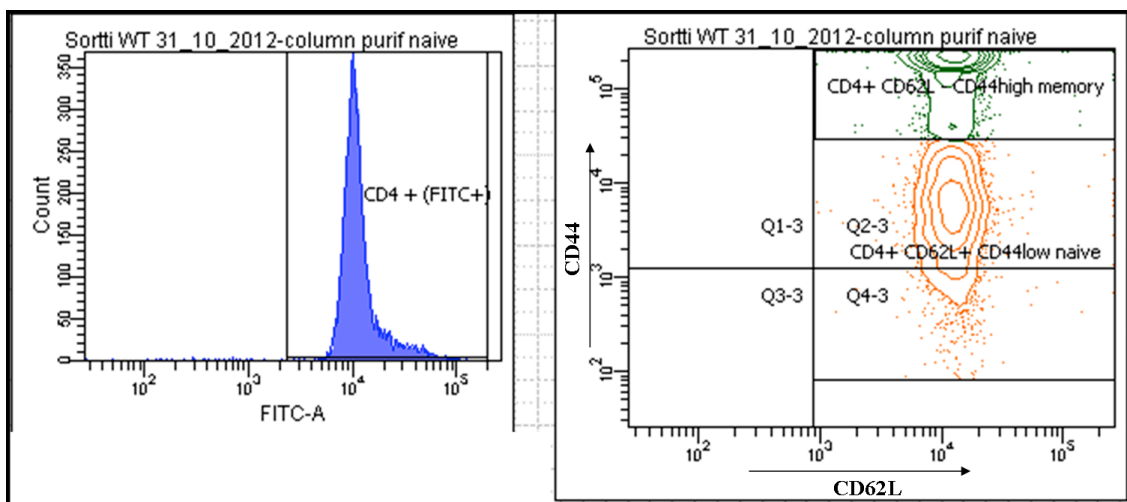
Kuva 5.1.2 Solueristuksen sekä anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuuden optimointi. IL-4 on värjätty PE-konjugoidulla vasta-aineella ja IFN $\gamma$  FITC-konjugoidulla vasta-aineella. Kuvan numeeriset arvot on ilmoitettu Kuvassa 5.1.1 ja niistä nähdään anti-CD28 ja anti-CD3 pitoisuuden ja solujen eristystavan vaikutus solujen sytokiini tuotantoon.

#### 4.1.2 Solujen eristysmetodi

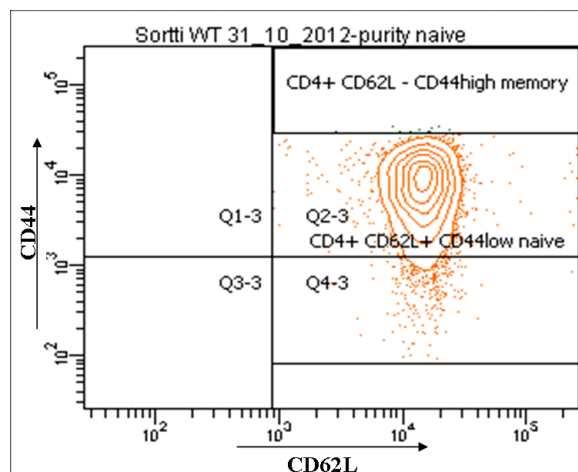
Kun verrattiin eri solujen eristysmetodeja, huomattiin, että virtausytometrialla lajiteltujen solujen sytokiini tuotanto on aina hieman alhaisempi. Tämä johtuu solujen puhtaustasosta. CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> eli naivien solujen pylväspuhdistus oli toimiva ja sen puhtaustaso oli hyvä n. 90% CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> -soluja, mutta FACS-



lajittelulla saatiin valittua juuri haluttu populaatio. Syynä sytokiinien suurempaan tuotantoon olivat CD44+ solut, joita pylväspuhdistus ei puhdistaa. CD44+ solut ovat efektori muistisoluja (kuvassa 5.1.2 merkitty vihreällä), jotka eivät varsinaisesti ole naiiveja soluja vaan ovat jo ohjelmoitu tiettyjen sytokiinien tuotantoon (E.T. Bloom ym. 1994). FACS-lajittelu valittiin solujen eristysmetodiksi solujen puhtaustason takia.



Kuva 5.1.3 CD4+ CD62L+ CD44low -solut. Vasemmanpuolinen kuvaaja kertoo pylväspuhdistuksen tehokkuudesta eristää CD4+ -solut. Oikeanpuoleisessa kuvaajassa vihreällä värillä on merkitty efektori muistisolut, jotka eivät ole naiiveja soluja vaan jo ohjelmoitu tuottamaan tiettyjä sytokiineja. Kasvatuksessa käytimme soluja, jotka osuvat Q2-3:n oranssilla värjätylle alueelle (CD4+ CD62L+ CD44low naive). Niiden osuus koko CD4+ populaatiosta on 46,2%. Efektori muistisolujen eli CD4+ CD62L+ CD44high solujen osuus koko CD4+ populaatiosta on 36,2%



Kuva 5.1.4 Tiheyskuvaaja FACS-lajiteltujen solujen puhtaudesta. CD4+ CD62L+ CD44low solujen osuus jo lajitelluista soluista on 99,1%

#### 4.2 Hiiripopulaation genotyypit

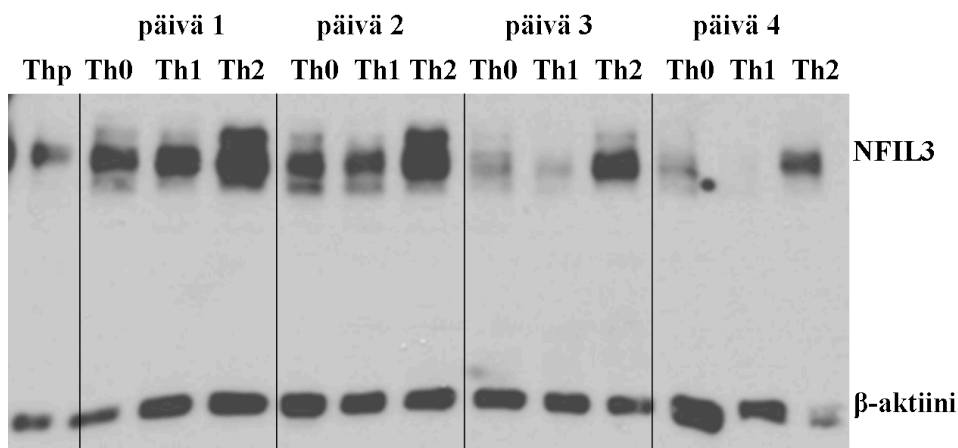
Hiirien genotyypit määritettiin PCR:n avulla (Liite 1). Lopullinen populaation koko oli 47 yksilöä ja se koostui 32 naaraasta ja 15 uroksesta. *Nfil3*<sup>-/-</sup> -hiiriä oli yhdeksän, joista vain kaksi oli uroksia. *Nfil3*<sup>+/+</sup> -hiiriä oli yhteensä kuusi ja *Nfil3*<sup>+/-</sup> -hiiriä 32. Uudet siitospariyhdistelmät suunniteltiin niin, että + -alleelia esiintyisi mahdollisimman vähän (liite 2). Paritukseen ei haluttu laittaa pelkkiä *Nfil3*<sup>-/-</sup> -hiiriä, sillä haluttiin nähdä onko + -alleelilla mahdollisesti vaikutusta hiirien pariutumiseen verrattuna *Nfil3*<sup>-/-</sup> genotyyppiin. NFIL3:n moninaisten vaikutusten esimerkiksi vuorokausirytmien säätelyn yhteyttä niiden seksuaaliseen käyttäytymiseen ei tunneta.

Kolmen kuukauden aikana siitosparit ovat tuottaneet kaksi pesuetta eli yhteensä 11 poikasta. Ensimmäisen pesueen kaikki yhdeksän poikasta olivat *Nfil3*<sup>+/-</sup> -hiiriä ja toisen pesueen kaksi poikasta olivat *Nfil3*<sup>-/-</sup> -hiiriä. Hiiripopulaatio on toistaiseksi liian pieni tutkimuksen jatkamiseksi, sillä suurin osa sen yksilöistä on heterotsygootteja *Nfil3*:n suhteen ja hyvään lymfosyyttisaantoon tarvitaan n. 4 pernaa.

### 4.3 NFIL3 ekspressiokinetiikka

Toivottiin, että intrasellulaarisella NFIL3:n värjäyksellä saataisiin määritettyä NFIL3 proteiinin ekspressiokinetiikka, mutta valitettavasti käytetty värjäysmetodi ei tuottanut tulosta ja päädyimme tekemään tämän osan western blot -menetelmällä. Taloudenpitoproteiinista nähdään, että western blot -menetelmää tehdessä geelin latausvaiheessa neljännen päivän Th2 näytettä ei ole latautunut saman verran kuin muita, eli ei nähdä onko Th2 kinetiikan suunta ylöspäin (Kuva.4.3.1). Täysin eksaktia tulosta western blot -menetelmällä ei koskaan saadakaan. Alla oleva kuva on kuitenkin enemmän kuin suuntaa antava. Thp soluissa eli naiveissa aktivoimattomissa Th-soluissa havaitaan NFIL3:a Th1-soluissakin NFIL3:a esiintyy runsaasti ensimmäisenä ja toisena kasvatuspäivänä aktivoinnin jälkeen, mutta myöhemmin sen määrä vähenee huomattavasti. NFIL3:n määrä lisääntyy IL-4:n läsnäollessa ja näin Th2-soluissa sitä huomataan jatkuvasti heti aktivoimisen jälkeen.

Seuraavaksi voimme keskittyä tutkimaan NFIL3:n tehtäviä solussa. Minkä sytokiinin tuottoa se säätelee ja millä mekanismilla säädellään itse NFIL3:n tuottoa. Th-solut ovat tymosyyteistä derivoituvia soluja, joilla NFIL3:a on luonnostaan alunperin (Tatsumi ym. 1990). Kateenkorvasta (engl. thymus) naiivit Th-solut kuljetetaan sekundaarisiin immuni järjestelmän elimiin kuten pernaan. Tässä vaiheessa NFIL3-proteiinia havaitaan, mutta myöhemmin T-solureseptorin (TCR) kautta tuleva signaali aktivoi tai inaktivoi tietyt geenit myöhempää erilaistumista varten. *Nfil3*-geeni hiljennetään Th1 ja Th0 olosuhteissa, mutta Th2-olosuhteissa se aktivoidaan proteiinituotantoon. Kuvasta 4.3.1 voidaan nähdä, että Th1-soluissa ja jopa Th0-soluissa sen tuotantoa säädellään aktiivisesti alaspäin. Kun taas Th2 olosuhteessa jo ensimmäisen päivän aikana NFIL3:n tuotanto on noussut ja pysyy korkeana muidenkin aikapisteiden näytteissä.



Kuva 4.3.1 NFIL3 ekspressiokinetiikka

NFIL3:n ekspressio vaihtelee päivittäin. Kuvassa Thp sekä Th0, Th1 ja Th2 -olosuhteissa kasvatettu ja western blot menetelmällä detektoitu proteiini. Taloudenpitoproteiinin  $\beta$ -aktiinin detektoinnilla nähdään onko proteiiniainesta ajettu geelillä saman verran kuoppaa kohden.

## 5 LOPUKSI

Solujen välinen kommunikointi on tärkeä tekijä kun halutaan ymmärtää jonkun sairauden toimintamekanismi ja mahdollinen ehkäisyttapa. Solujen kommunikointi tapahtuu yleensä proteiinien välityksellä ja yksittäisellä proteiinilla voi olla tärkeä rooli jonkin sairauden synnyssä, jos se esim. vaikuttaa toisen proteiinin ilmentymiseen ja näin katkaisee tärkeän kehitysketjun. Immunologia tutkii yksilön vastustuskykyyn liittyviä solun kommunikointimekanismeja ja jos jokin proteiini esimerkiksi puuttuu kokonaan voi potilaan terveydentila poiketa täysin normaalista. NFIL3 on kriittinen tekijä mm. astman kehittymisessä (Kashiwada ym. 2011).

Yksilön immunologiseen statukseen liittyviä seikkoja voidaan tutkia tarkastelemalla muun muassa soluja, proteiineja, RNA:ta tai DNA:ta. Tuloksia ja niiden pohdintaa on hyvä käydä läpi vertaistutkimusryhmän kanssa esim. tutkimuksen hiirimalliryhmän ja ihmismalliryhmän välillä. Tutkimuksen alussa

metodien optimoiminen on väistämätön tehtävä. Menetelmien optimoiminen ja odottamattomien ongelmien ratkaiseminen tekevät tutkimuksen alkuvaiheen aikataulun suunnittelemisen vaikeaksi. Siihen onkin vain varattava aikaa riittävästi ja varauduttava mahdollisiin ongelmiin. Työskentelytavat ja menetit täytyy todeta hyväksi jos ne otetaan käyttöön tutkimuksessa myöhempien spekulointien välttämiseksi. Solujen eristystapa ja kasvatusmetodi on optimoitu Th2-solututkimukselle sopivaksi ja hiirien genotyypit on määritetty. Vaikka siitosparien genotyypit eivät olleet oletusten mukaisia ja tutkimuksen suunta muuttui täysin, on alkuvalmistelut ja optimoinnit tehty ja tutkimusta voidaan jatkaa kun materiaalin määrä on lisääntynyt. Syntyvien hiirien genotyypit voidaan määrittää rutiinisti samalla optimoidulla PCR-tekniikalla.

Tulevaisudessa NFIL3 transkriptiotekijän sitoutumispaikka genomissa ja sen kanssa interaktivoivat proteiinit voidaan selvittää CHIP -menetelmää (engl. Chromatin Immuno precipitation) eli kromatiinin immuunisaostus -menetelmää käyttäen. Näin vahvasti immuunisysteemiin kytköksissä olevan proteiinin säätelymekanismit ovat tärkeitä yksityiskohtia autoimmuunisairauksien kuten astman tuntemisessa ja sitä kautta niiden ehkäisyssä.

## **KIITOKSET**

Haluan kiittää Riitta Lahesmaata, joka otti minut kesätöihin Turun Biotekniikan Keskukseen kesällä 2011 ja on mahdollistanut lopputyöni tekemisen tässä mielenkiintoisessa projektissa. Kiitokset myös koko BTK:n henkilökunnalle, jolta olen oppinut paljon biotekniikan tutkimuskeskuksen toiminnasta ja ATLAS-ryhmälle, jonka jäsenet ovat innostaneet minua kehittämään itseäni juuri immunologian alueella. Erityinen kiitos kuuluu ohjaajalleni Sanna Edelmanille selkeästä ja tehokkaasta ohjauksesta opinnäytetyöni parissa ja kaikesta muustakin avusta. Kiitos myös tuesta, ideoista ja rakkaudesta Xavier De La Huertalle, koko perheelleni ja ystävälleni Anna-Kaisa Kartesalolle.

## LÄHTEET

Annunziato, F. & Romagnani, S. 2009 Heterogeneity of human effector CD4+ T cells, BioMed central Ltd, Italy

Bennett, J.P., Cockcroft, S. & Gomperts, B.D., 1979 Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex, *Nature* 282(5741):851-853.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature* 441, 235-238

Bloom, E.T., Mostowski, H.S., Horvath. 1994. Does the age-related change in CD44-defined T-cell subsets have functional significance for cytotoxic T lymphocyte generation? *Immunology Letters* 40(3) 251-258

Cousins, D.J., Lee, T.H. & Staynov D.Z. 2002, Cytokine Coexpression During Human Th1/Th2 Cell Differentiation: Direct Evidence for Coordinated Expression of Th2 Cytokines, *The journal of immunology*.

Cowell, I.G. 2002. E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *Bioessays*. Volume 24 issue 11 1023-9

Ellinger, A., Pavelka, M., 1984, Effect of monensin on the Golgi apparatus of absorptive cells in the small intestine of the rat. Morphological and cytochemical studies. *Cell Tissue Res.*, 235(1):187-94.

Fields, P.E., Lee, G.R., Kim, S.T., Bartsevich, V.V. & Flavell, R.A. 2004 Th2-Specific Chromatin Remodeling and Enhancer Activity in the Th2 Cytokine Locus Control Region 21(6):865-876

Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D., & Brady, H.J.M. 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nature Immunology* 10:1118-1124.

Haapanen, K. & Hildén, H. 2001. Geeniekspressio STAT4- ja STAT6-poistogeenisten hiirten CD4+ T-soluissa. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, Terveysala

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M.J., 2005, Immunobiology. 5.painos The Immune System in Health and Disease. Garland Science, New York

Kashiwada, M., Cassel, S.L., Colgan, J.D. & Rothman, P.B. 2011. NFIL3/E4BP4 controls type 2 T helper cell cytokine expression *The EMBO Journal* 30:2071-2082

Kleijn, M., & Proud, C.G. 2002. The regulation of protein synthesis and translation factors by CD3 and CD28 in human primary T lymphocytes *BMC Biochemistry* 3:11

Lanier, L.L. & Warner, N.L.. 1981. Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis *Journal of Immunological Methods* 47(1):25-30

Male, V., Nisoli, I., Gascoyne, D.M., Brady, H.J.M. 2011. E4BP4: an un expected player in the immune response. *Trends in Immunology* 33(2):98-102

Motomura, Y., Kitamura, H., Hijikata, A., Matsunaga, Y., Matsumoto, K., Inoue, H., Atarashi, K., Hori, S., Watarai, H., Zhu, J., Zhu, J., Taniguchi, M. & Kubo, M. 2011. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL13 in CD4+ T cells. *Nature Immunology* 12:450-459

Primrose, S.B. 1991. *Molecular Biotechnology* second edition. Blackwell scientific publications.

Rautajoki, K. 2007. *Regulatory mechanisms involved in Th2 cell differentiation*. Väitöskirja. University of Turku and Turku Graduate School of Biomedical Sciences. Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology

Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, A.J. & Tatum, E.L. 1962. Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 48(7):1238-1245

Rickwood D. & Hames, B.D. Edited by F. R. Balkwill. 1995. *Cytokines – A practical approach* 2. painos. Oirl Press at Oxford University

Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. 1998. *Immunology* 5. painos. Mosby International Ltd. Iso-Britannia

Romagnani S. 1999. Th1/Th2 cells - Inflammatory Bowel diseases. 5(4):239-314 1999 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

Salo V. 2011. Th17 -solut - ystäviä vai vihollisia? Ihmisen Th17-solujen genominlaajuinen expressioanalyysi. Pro gradu -tutkielma, Turun yliopisto, Terveystieteet.

Shapiro, H.M 2003. *Practical flow cytometry*, Fourth edition. WILEY-LISS

Tatsumi, Y., Kumanogoh, A., Saitoh, M., Mizuhima, Y., Kimura, S., Suzuki, S., Yagi, Y., Horiuchi, A., Ogata, M. & Hamaoka, T. 1990. Differentiation of thymocytes from CD3-CD4-CD8- through CD3-CD4-CD8+ into more mature stages induced by a thymic stromal cell clone, *Immunology* 87:2750-2754 USA

Touraine, J.L., Hadden, J.W., Touraine, F., Hadden, E.M., Estensen, R., Good, R.A., 1977, Phorbol myristate acetate: A mitogen selective for a T-lymphocyte subpopulation, *The Journal of Experimental Medicine* 145, New York

Tuomela S. 2002 *Stat 6 -kohdegeenien tunnistus proteomiikan keinoin*. Pro gradu -tutkielma, Turun yliopisto, Biologian laitos.

Liite 1. *Nfil3*-poistogeenisen hiiripopulaation genotyypit

Sinisellä, keltaisella ja punaisella on merkitty alkuperäiset siitosparit ajalta, jolloin kaikkien knock out hiirien oletettiin olevan genotyypiltään *Nfil3*<sup>-/-</sup>.

DNA code	sex	parents	DOB	genotype
001	M	M0/F0	7.5.11	+/-
002	F	M0/F0	7.5.11	-/-
003	M	M0/F0	7.5.11	+/-
004	F	M0/F0	21.6.11	+/+
005	M	M0/F0	7.5.11	-/-
006	F	M0/F0	21.6.11	+/+
007	F	M0/F0	21.6.11	-/-
008	F	M0/F0	21.6.11	+/+
009	F	001/002	21.9.11	-/-
010	F	001/002	21.9.11	-/-
011	F	001/002	21.9.11	-/-
012	F	001/002	21.9.11	-/-
013	F	005/006	27.9.11	+/-
014	F	005/006	27.9.11	+/-
015	F	005/006	27.9.11	+/-
016	F	005/006	27.9.11	+/-
017	F	003/004	10.10.12	+/+
018	F	003/004	10.10.12	+/+
019	F	003/004	10.10.12	+/+
020	F	003/004	10.10.12	+/-
021	M	005/006	12.11.12	+/-
022	M	005/006	12.11.12	+/-
023	F	005/006	12.11.12	+/-
024	F	005/006	12.11.12	+/-
025	F	005/006	12.11.12	+/-

DNA code	sex	parents	DOB	genotype
026	F	005/006	12.11.12	+/-
027	F	005/006	12.11.12	+/-
028	M	003/004	15.11.11	+/-
029	M	003/004	15.11.11	+/-
030	M	003/004	15.11.11	+/-
031	M	003/004	15.11.11	+/-
032	M	003/004	15.11.11	+/-
033	F	003/004	15.11.11	+/-
034	F	003/004	15.11.11	+/+
035	F	003/004	15.11.11	+/-
036	F	003/004	15.11.11	+/-
037	M	003/004	27.12.11	+/-
038	M	003/004	27.12.11	+/-
039	M	003/004	27.12.11	+/-
040	M	003/004	27.12.11	+/-
041	F	003/004	27.12.11	+/-
042	F	003/004	27.12.11	+/-
043	F	003/004	27.12.11	+/-
044	F	003/004	27.12.11	+/-
045	F	003/004	27.12.11	+/-
046	M	005/009	08.02.12	-/-
047	F	005/009	08.02.12	-/-



**Liite 2. Uudet siitosparit**

DNA code	sex	parents	DOB	genotype
1	M	M0/F0	7.5.11	+/-
2	F	M0/F0	7.5.11	-/-
5	M	M0/F0	07.05.11	-/-
9	F	001/002	21.9.11	-/-
21	M	005/006	12.11.11	+/-
10	F	001/002	21.9.11	-/-
22	M	005/006	12.11.11	+/-
11	F	001/002	21.9.11	-/-
46	M	005/009	08.02.12	-/-
47	F	005/009	08.02.12	-/-

