

# TCF7-transkriptiotekijän merkitys T-auttajasolujen erilaistumisessa

Marjo Linja  
Pro gradu -tutkielma  
Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Biotekniikka  
Marraskuu 2009

## Alkusanat

Tämä työ tehtiin Turun Biotekniikan keskuksessa professori Riitta Lahesmaan tutkimusryhmässä.

Haluaisin kiittää Riitta Lahesmaata kaikesta tuesta ja kannustuksesta koko opiskeluaikani, sekä mahdollisuudesta palata Atlas-ryhmään gradun merkeissä. Lisäksi isot kiitokset ohjaajalleni Helena Ahlforsille, jonka tarttuva innokkuus ja luottamus saivat palaamaan gradun pariin yhä uudelleen, vaikka työt ja muu elämä houkuttelivat usein enemmän kuin kirjoittaminen. Haluan kiittää myös koko Atlas-ryhmää ja Biotekniikan keskuksen henkilökuntaa kaikesta avusta, etenkin Anne Rokkaa ja Helena Saarentoa vinkeistä 2D-immunoblottauksen suunnittelussa. Erityskiitokset Raija Andersenille avusta 2D-immunoblottauksen toteutuksessa ja pähkäilyssä, kun kaikki ei mennytkään niin kuin oli suunniteltu.

Lopuksi haluaisin kiittää perhettäni ja ystäviäni ymmäryksestä, myötätunnosta ja järjen puhumisesta, sekä kohtalotovereitani Susannaa, Johannaa ja Kirsiä, joiden kanssa kanssa kahvin tai oluen ääressä tulimme aina samaan tulokseen: opinnot voi saada valmiiksi töistä huolimatta ja kyllä se gradu valmistuu, vaikka kirjoittamisen edistymistä ei aina huomaa.

---

<b>Tekijä:</b>	Marjo Linja
<b>Tutkielman nimi:</b>	TCF7-transkriptiotekijän merkitys T-auttajasolujen erilaistumisessa
<b>English title:</b>	Role of Transcription Factor TCF7 in the Differentiation of T Helper Cells
<b>Päivämäärä:</b>	25.11.2009 <b>Sivumäärä:</b> 59
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
<b>Oppiaine:</b>	Biotekniikka
<b>Tutkielman ohjaajat:</b>	Helena Ahlfors ja Riitta Lahesmaa

---

### Tiivistelmä:

Kaikki verisolut kehittyvät luuytimen hematopoieettisista kantasoluista. Kypsyessään solut ohjelmoituvat tiettyyn kehityslinjaan ympäristöstään saamiensa signaalien ohjaamana. T-lymfosyytit kypsyvät kateenkorvassa saaden signaaleja kateenkorvan epiteelin soluilta. Usean kehitysvaiheen aikana soluista valitaan ne, jotka tunnistavat vieraat antigeenit, eivätkä sitoudu liian voimakkaasti omien solujen rakenteisiin. Kypsyttyään naiivit T-auttajasolut (Th) vapautetaan elimistöön, jossa ne antigeeninsä kohdattuun aktivoituvat ja erilaistuvat Th1- tai Th2-soluiksi ympäristöstään saamiensa sytokiinisignaalien ohjaamana. T-auttajasolujen tuottamat sytokiinit ohjaavat muita immuunipuolustuksen soluja. Th1 solut stimuloivat mm. makrofageja ja tappaja-T-soluja ja Th2-solut stimuloivat B-soluja. T-auttajasoluilla on merkittävä rooli myös immunivälitteisissä taudeissa, kuten autoimmuunitaudeissa, allergiassa ja astmassa.

Kun erilaistuvia Th1- ja Th2-soluja on aiemmin tutkittu mikrosiruilla, on transkriptiotekijä TCF7:n havaittu ilmenevän vähemmän Th2-soluissa kaksi vuorokautta erilaistumiskasvatuksen alettua. Havainto pitää paikkansa myös proteiinitasolla. TCF7:n tiedetään olevan tärkeä T-solujen kehitykselle kateenkorvassa ja on ajateltu, että se voisi säädellä myös solujen erilaistumista kateenkorvan ulkopuolella. TCF7 on osa Wnt-signaalinvälitysreittiä, joka on olennainen monien kudosten ja solujen kehitykselle. Aikuisella TCF7 ilmenee vain T-lymfosyyteissä. TCF7-proteiinista on monta eri isoformia, joiden merkityksestä ei ole juurikaan tietoa. Jokaisesta isoformista on sekä lyhyt että pitkä muoto. Pitkät muodot sitovat  $\beta$ -kateniinia, joka yhdessä TCF7:n kanssa aktivoi Wnt-kohdegeenien transkription, kun taas lyhyiden muotojen on ajateltu estävän transkriptiota. Tutkiaksemme TCF7:n isoformien tehtäviä T-auttajasolujen erilaistumisessa halusimme liittää TCF7:n 2S- ja 2L-isoformit vektoriin yli-ilmenemiskasvatuksia varten. Lisäksi tahtoimme erotella 2D-immunoblottauksen avulla, mitkä isoformit ilmenevät Th1- ja Th2-soluissa. Tutkimistamme näytteistä ei saatu monistettua 2L-muotoa. 2S-muotoa kloonatessa monistettiin pätkä, joka sisälsi 2S-muodon alun ja lopun. Tästä syntyvä proteiini olisi pituudeltaan vain 110 aminohappoa, eikä sisältäisi edes kokonaan proteiiniperheelle tyypillistä DNA:ta sitovaa aluetta. Kloonattu muoto tuskin on toimiva TCF7-proteiinin isoformi ja puuttuvat eksonit ovat todennäköisesti poistettu jo mRNA:sta. 2D-immunoblottauksessa TCF7-vasta-aine ei antanut signaalia, joten emme pystyneet selvittämään, mitä isoformeja Th1- ja Th2-soluissa ilmennetään.

TCF7:n merkitystä T-auttajasolujen erilaistumisessa selvitettiin hiljentämällä TCF7:n ilmeneminen siRNA:n avulla. Soluja kasvatettiin rinnakkain kontrollisolujen kanssa ja niille annettiin joko Th1- tai Th2-signaaleja. Viikon kasvatuksen aikana kerätyistä RNA-näytteistä mitattiin reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n avulla sekä TCF7:n ilmeneminen että merkkigeenejä, jotka ilmenevät enemmän joko Th1- tai Th2-soluissa. Lisäksi viimeisenä kasvatuspäivänä mitattiin virtausytometrillä paljonko solut tuottavat IFN $\gamma$ :a ja IL4:ää. Jokaisessa kasvatuksessa TCF7 oli selvästi hiljennetty kahden ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta kasvatuksen lopussa hiljeneminen oli loppunut. Geenit, jotka kertovat T-auttajasolujen erilaistumisesta Th1-suuntaan, ilmenevät TCF7-hiljennettyjen näytteiden Th1-soluissa vähemmän kasvatuksen kahden ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta enemmän kasvatuksen lopussa. Th1-solut myös tuottivat hieman enemmän IFN $\gamma$ :a kuin kontrollinäytteiden Th1-solut. Th2-solujen geenien ilmenemiseen tai sytokiinituottoon ei TCF7:n hiljentämisellä näyttänyt olevan juurikaan merkitystä. Näyttäisi siltä, että kun TCF7 on hiljennetty, solujen erilaistuminen Th1-soluiksi hidastuu.

---

**Avainsanat:** T-solujen kypsyminen, T-auttajasolujen erilaistuminen, transkriptiotekijä TCF7

---

**Author:** Marjo Linja  
**Title of thesis:** Role of Transcription Factor TCF7 in the Differentiation of T Helper Cells  
**Finnish title:** TCF7-transkriptiotekijän merkitys T-auttajasolujen erilaistumisessa  
**Date:** 25.11.2009 **Pages:** 59

**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Biotechnology  
**Supervisors:** Helena Ahlfors and Riitta Lahesmaa

---

**Abstract:**

All the blood cells develop from the hematopoietic stem cells in the bone marrow. Cells receive signals from their environment and commit to certain developmental lineage. T lymphocytes develop in the thymus in contact with the epithelium. After several maturation steps T-cells capable of recognizing foreign antigens and not binding too tightly to self peptides are released into circulation. When naïve T helper (Th) cells meet their antigen they become activated and are differentiated into subsets of Th1 or Th2 depending on the cytokine stimulation. Cytokines produced by Th1 and Th2 cells guide the other cells of the immune system; Th1 cytokines stimulate macrophages and killer T-cells and Th2 cytokines stimulate B cells. These subsets also play an important role in the immune mediated diseases such as autoimmune diseases, allergy and asthma.

Previously, transcription factor TCF7 was found to be down regulated at 48 h in Th2 cells in microarray experiments and the finding was also confirmed on protein level. TCF7 is known to be an important regulator of T cell development in thymus, and it is suggested to regulate also the peripheral T cell differentiation. Transcription factor TCF7 is a part of the Wnt signalling cascade having an important role in the development of many cells and tissues. However, in adult animals TCF7 is expressed only in T lymphocytes. TCF7 has several isoforms whose functions are mostly not known. Each isoform exists in long and short form. The long forms are capable of binding  $\beta$ -catenin which is required to activate transcription of Wnt target genes. Thus, the short forms are thought to repress transcription. For overexpression studies two isoforms of TCF7, 2S and 2L, were decided to be inserted to a cloning vector. Also, to find out which isoforms actually are expressed in Th1 and Th2 cells 2D-western blotting was performed. However, the 2L-isoform could not be amplified with PCR and the cloning of the 2S-form resulted in a shorter version which contains only the beginning and end of the protein but 159 amino acids in the middle are missing. Such a form is hardly an actual isoform but rather the missing part is lost already in the mRNA level. In the 2D-western blotting TCF7-antibody failed to detect anything in the blot, so we were unable to find out which isoforms are present in the Th1 and Th2 cells.

To study the role of TCF7 in T helper cell differentiation, expression of TCF7 was silenced using siRNA nucleofection technique, and Th cell differentiation cultures were performed. During the culture RNA-samples were collected and the expression of TCF7 as well as marker genes preferentially expressed either in Th1 or Th2 cells were analysed by real-time quantitative PCR. Also, during the last day of the culture production of IFN $\gamma$  and IL4 was measured with flow cytometry. Expression of TCF7 was silenced in all the cultures during the first two days but the effect disappeared after that. Th1 marker genes were found to be less expressed in Th1 cells in the beginning of the culture. However, after a week these genes were expressed slightly more. Also, Th1 cells produced slightly more IFN $\gamma$  in siRNA treated samples compared to controls. In Th2 cells the silencing of TCF7 did not seem to have a notable effect on gene expression or cytokine production. These findings indicate that in the absence of TCF7 differentiation into Th1 cells is slightly impaired as indicated by the change of expression profile of Th1 marker genes.

---

**Keywords:** T cell development, T helper cell differentiation, Transcription factor TCF7

# Sisällysluettelo

ALKUSANAT

TIIVISTELMÄ

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET

<b>1. JOHDANTO .....</b>	<b>9</b>
1.1. T-AUTTAJASOLUT .....	9
1.1.1. T-AUTTAJASOLUJEN KYPSYMINEN .....	9
1.1.2. T-AUTTAJASOLUJEN JAOTTELU .....	11
1.2. TRANSKRIPTIOTEKIJÄ TCF7 .....	13
1.2.1. WNT-SIGNALOINTI.....	13
1.2.2. TCF/LEF-PROTEIINIEN MONIMUOTOISUUS.....	14
1.2.3. TCF7-TRANSKRIPTIOTEKIJÄN TEHTÄVÄT.....	15
1.3. GEENIEN ILMENEMISEN MITTAAMINEN .....	17
1.4. RNA-INTERFERENSSI.....	18
<b>2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS .....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....</b>	<b>21</b>
3.1. TCF7:N 2S- JA 2L-MUOTOJEN KLOONAUUS .....	21
3.1.1. TCF7:N 2S JA 2L MUOTOJEN MONISTUS PCR:LLÄ.....	21
3.1.2. PCR-TUOTTEIDEN LIITTÄMINEN VEKTORIIN JA TRANSFORMAATIO.....	22
3.1.3. PESÄKE-PCR JA PLASMIDIPUHDISTUS .....	23
3.2. 2D-IMMUNOBLOTTAUS.....	24
3.2.1. ISOELEKTRINEN FOKUSOINTI.....	24
3.2.2. SDS-POLYAKRYYLIAMIDIGEELIELEKTROFOREESI (SDS-PAGE) .....	25
3.2.3. IMMUNOBLOTTAUS .....	26
3.3. NUKLEOFEKTIOKASVATUKSET .....	21
3.3.1. PLASMIDIEN ERISTYS.....	27
3.3.2. SOLUJEN ERISTÄMINEN .....	27
3.3.3. NUKLEOFEKTIOT.....	28

3.3.4. ELÄVIEN H2K <sup>K</sup> -POSITIIVISTEN SOLUJEN RIKASTAMINEN.....	29
3.3.5. NUKLEOFEKTIOTEHOKKUUDEN JA ELÄVYYDEN ARVIOIMINEN VIRTAUSSYTOTOMETRILLÄ .....	30
3.3.6. ERILAISTAMISKASVATUS .....	30
3.3.7. SYTOKIINITUOTON MITTAAMINEN INTRASELLULAARISEN VÄRJÄYKSEN AVULLA .....	32
3.3.8. GEENIEN ILMENEMISEN MITTAAMINEN REAALIAIKAISELLA KVANTITATIIVISELLA PCR:LLÄ.....	33
<b>4. TULOKSET.....</b>	<b>36</b>
4.1. TCF7:N 2S- JA 2L-ISOFORMIEN KLOONAUS .....	36
4.2. 2D-IMMUNOBLOTTAUS.....	38
4.3. NUKLEOFEKTIOKASVATUKSET .....	39
4.3.1. IFN $\gamma$ :N JA IL4:N TUOTTO .....	40
4.3.2. GEENIEN ILMENEMINEN.....	43
<b>5. TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>51</b>
5.1. TCF7:N 2S- JA 2L-MUOTOJEN KLOONAUS .....	53
5.2. NUKLEOFEKTIOKASVATUKSET .....	52
<b>LÄHTEET.....</b>	<b>53</b>

## Lyhenteet

ah	Aminohappo
BC	Buffy coat. Kokoverestä sentrifugoimalla erotettu solukerros, joka sisältää suurimman osan kokoveren valkosoluista ja verihiutaleista
BSA	Naudan seerumin albumiini
CD	Valkosolujen pintamolekyylit (Cluster of Differentiation)
cDNA	Komplementaarinen DNA
Ct	PCR-ohjelman kohta, jossa amplifikaatiosta syntyvä signaali nousee yli asetetun kynnyksarvon (Threshold Cycle)
CTNNB1	$\beta$ -kateniini. Proteiini, joka on osa kadheriiniproteiinikompleksia, sekä Wnt-viestinvälitysreittiä
dNTP	Deoksinukleosidi-5'-trifosfaatti, nukleotidiseos
FITC	Fluoreseiini-isotiosyanaatti
HMG-box	Proteiinin toiminnallinen alayksikkö, joka voi sitoutua DNA:han (High Mobility Group box)
IFN	Interferoni. Immuunijärjestelmän solujen tuottama välittäjäaine
IL	Interleukiini. Immuunijärjestelmän solujen tuottama välittäjäaine
Jak	Janus-kinaasi. Tyrosiinikinaasi, joka on osa sytokiinien välittämien signaalien JAK-STAT – viestinvälitysreittiä
LB	Luria-Bertani, kasvatusliuos
MHC	Major Histocompatibility Complex. Solun proteiiniineja, jotka sitovat peptideitä ja kuljettavat niitä antigeeniä esittelevän solun pinnalle
PAGE	Polyakryyliamidigeelielektroforeesi
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymeraasiketjureaktio. Molekyylibiologian menetelmä, jolla voidaan monistaa haluttua sekvenssiä, esimerkiksi tiettyä geeniä
PE	Fykoerytriini

PVDF	Polyvinyylideenifluoridi
RNAi	RNA-interferenssi. Geenin ilmenemisen hiljentäminen
rpm	Kierrosta minuutissa (Rounds per Minute)
RT-qPCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
siRNA	Lyhyt kaksinauhainen RNA-pätkä, joka saa aikaan RNA-interferenssin (Small interfering RNA)
STAT	Transkriptiotekijä, joka on osa sytokiinien välittämien signaalien JAK-STAT – viestinvälitysreittiä (Signal Transducers and Activator of Transcription)
Th	T-auttajasolu (T helper)



# 1. Johdanto

## 1.1. T-auttajasolut

Elimistön immuunipuolustukseen osallistuu useita erilaisia soluja, jotka viestivät keskenään. T-auttajasolut tunnistavat elimistölle vieraita rakenteita ja tuottavat merkkiaineita, sytokiineja, jotka ohjaavat muiden immuunipuolustuksen solujen toimintaa.

### 1.1.1. T-auttajasolujen kypsyminen

Verisolujen tuotto alkaa jo varhaisen sikiönkehityksen aikana. Aluksi verisoluja tuotetaan useissa elimissä, mm. maksassa ja pernassa, mutta 30. raskausviikolta lähtien verisolujen tuotto keskittyy luuytimeen. Kaikki verisolut kypsyvät luuytimen hematopoeettisista kantasoluista. Kantasolut saavat kasvu ympäristöstään signaaleja, jotka ohjaavat mihin kehityssuuntaan solu erilaistuu. Esimerkiksi IL7 (interleukiini-7) -signaalien on havaittu ohjaavan luuytimen kantasoluja lymfosyyttikehityssuuntaan (ks. yleiskatsaus Blom ja Spits, 2006; yleiskatsaus Ye ja Graf, 2007). Kun luuytimen hematopoeettinen kantasolu alkaa erilaistua tiettyyn kehityssuuntaan, muihin kehityssuuntiin ohjaavien geenien ilmeneminen sammutetaan vähitellen (ks. yleiskatsaus Ye ja Graf, 2007).

T-solujen kypsyminen tapahtuu kateenkorvassa vuorovaikutuksessa kateenkorvan solujen kanssa. T-solujen esiasteet siirtyvät luuytimeestä kateenkorvaan kemokiinien ohjaamina (ks. yleiskatsaus Ikuta ym., 1992). Vaikka solut ovat saaneet ensimmäiset T-solukehityssuuntaan ohjaavat signaalit jo luuytimessä, varhaisimpien kateenkorvaan vaeltavien solujen on kuitenkin havaittu olevan multipotentteja, eli ne voivat vielä erilaistua lymfosyyttien lisäksi myös muiksi verisoluiksi (ks. yleiskatsaus Anderson, 2006). Kehittyvät T-solut käyvät kateenkorvassa läpi monia kehitysvaiheita. Epäkypsät T-solut siirtyvät kateenkorvan osasta toiseen kehitysvaiheiden mukaan kemokiinien ohjaamina (ks. yleiskatsaus Lai ja Kondo, 2008). Kypsyessään T-solujen esiasteet menettävät ensin kykynsä erilaistua erytrosyyteiksi tai megakaryosyyteiksi ja myöhemmin vielä granulotsyyteiksi ja monosyyteiksi (ks. yleiskatsaus Rodewald, 1995; yleiskatsaus Blom ja

granulosyyteiksi ja monosyyteiksi (ks. yleiskatsaus Rodewald, 1995; yleiskatsaus Blom ja Spits, 2006). Notch-signaloinnilla on merkittävä rooli kypsyvien solujen ohjelmoitumisessa T-solukehityssuuntaan (ks. yleiskatsaus Ye ja Graf, 2007). Transkriptiotekijät GATA-3 ja TCF7 ovat Notch-signaloinnin kohdegeenejä kateenkorvan varhaisissa T-solujen esias-teissa (ks. yleiskatsaus Anderson, 2006). Nämä transkriptiotekijät vuorostaan vaikuttavat useiden muiden geenien ilmenemiseen (Ting ym., 1996).

Jo ennen kuin T-solut ilmentävät antigeeniä tunnistavan T-solureseptorin geenejä ja lymfo-syyteille tyypillisiä pintamolekyylejä (CD), CD3 (kaikki lymfosyytit), CD4 (T-auttajasolut) ja CD8 (T-tappajasolut), ne kykenevät aktivoitumaan, kasvattamaan kokoaan ja jakautumaan nopeasti (Zúñiga-Pflücker ym., 1993; yleiskatsaus Rothenberg ym., 2008). Näiden T-soluille tyypillisten ominaisuuksien avulla solumäärä kasvaa nopeasti, vaikka vain suhteellisen pieni määrä kehittyviä T-soluja siirtyy kehitysvaiheesta toiseen. Solujen aktivaation on ajateltu edistävän myös ohjelmoitumista T-solukehityssuuntaan. Kypsyessään T-solu ilmentää rekombinaatiota aktivoivia geenejä ja T-solureseptoria oh-jaavat geenit järjestäytyvät uudelleen tehden uusia yhdistelmiä geenien osista (ks. yleiskat-saus Miosge ja Zamoyska, 2007). Tarkoituksena on tuottaa geeneistä mahdollisimman pal-jon erilaisia kombinaatioita (Lee ym., 2004). Suurin osa T-solujen T-solureseptoreista koostuu  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjusta, mutta pienellä osalla reseptori koostuu  $\gamma$ - ja  $\delta$ -ketjuista. T-solureseptorigeenien ilmeneminen on säädelty kehityksen mukaan, ensin ilmennetään  $\gamma$ - ja  $\delta$ -geenejä, sitten  $\beta$ - ja lopuksi  $\alpha$ -geenejä (ks. yleiskatsaus Ikuta ym., 1992).

Kypsillä T-soluilla on keskeinen rooli immuunipuolustuksessa, joten eri kehitysvaiheissa kypsyvistä T-soluista valitaan vain ne, jotka toimivat halutulla tavalla. Kun T-solureseptorin  $\beta$ -ketju on saatu järjestettyä, solu käy läpi  $\beta$ -valinnan.  $\beta$ -valinnassa poiste-taan apoptoosin avulla ne solut, joiden T-solureseptori ei pysty sitomaan  $\alpha$ -ketjua ja muo-dostamaan reseptoria solun pinnalle CD3-signaalinvälitysmolekyylin kanssa (ks. yleiskat-saus Miosge ja Zamoyska, 2007). Kun solut ovat järjestäneet uudelleen myös T-solureseptorin  $\alpha$ -ketjun, solujen toimintaa arvoidaan jälleen. Mikäli solujen  $\alpha\beta$ -antigeenireseptori on vuorovaikutuksessa kateenkorvan kuoren epiteelisolujen MHC (ma-jor histocompatibility complex) -molekyylin ja sen sisältämän peptidin kanssa, solut sääs-tyvät apoptoosilta. Tätä kutsutaan positiiviseksi valinnaksi. Tässä vaiheessa solut ilmentä-

vät pinnallaan CD3-molekyylin lisäksi CD4:ää ja CD8:aa. MHC-molekyylin luokasta riippuen solu erilaistuu ilmentämään pinnallaan joko CD4 (luokan II MHC) tai CD8-molekyylä (luokan I MHC) ja tulee kypsäksi T-soluksi (ks. yleiskatsaus Miosge ja Zamoyska, 2007). Positiivisessa valinnassa valikoituneet solut vaeltavat kateenkorvan ytimeen, jossa liian vahva kontakti ytimen epiteeli- ja dendriittisolujen kanssa johtaa apoptoosiin (negatiivinen selektio) (ks. yleiskatsaus Miosge ja Zamoyska, 2007). Näillä soluilla on silloin T-solureseptori, joka sitoutuu liian tehokkaasti omiin peptideihin MHC-molekyylin yhteydessä. Kypsät CD4+ ja CD8+ solut siirtyvät kateenkorvasta verenkiertoon naiiveina T-soluina (Lee ym., 2004).

### 1.1.2. T-auttajasolujen jaottelu

T-auttajasolut (T helper, Th) voidaan jakaa eri alatyyppeihin solujen tuottamien sytokiinien perusteella (Mosmann ym., 1986). Alun perin solut jaettiin vain Th1- tai Th2-soluihin, mutta myöhemmin on tunnistettu myös muita alatyyppejä, kuten Th17 ja Th9 (ks. yleiskatsaukset Zhou ym., 2009; Soroosh ja Doherty, 2009). Toistaiseksi Th1- ja Th2-solut ovat alatyypeistä edelleen tunnetuimmat. Th1-solut ovat erityisen tärkeitä soluvälitteisessä ja Th2-solut humoraalisessa immuunipuolustuksessa. Solupopulaatiota, joka tuottaa sekä Th1- että Th2-sytokiineja, kutsutaan Th0:ksi (Firestein ym., 1989). Immuunipuolustuksen lisäksi Th1- ja Th2-vasteet ilmenevät tietyissä taudeissa. Voimakas Th1-vaste liitetään esim. tulehdusreaktioihin ja autoimmuunisairauksiin, kun taas voimakas Th2-vaste mm. allergiaan ja astmaan (ks. yleiskatsaus Romagnani, 1996).

T-auttajasolujen eri alatyypit erilaistuvat yhteisestä esiasteesta, joka on kateenkorvassa kypsynyt naiivi CD4+ T-auttajasolu (Thp). Thp-solut kypsyvät toiminnallisiksi soluiksi saatuaan signaalin antigeeniä esittelevältä solulta. Aktivoituakseen T-auttajasolu vaatii signaalin sekä T-solureseptorikompleksin että kostimulatoristen molekyyliden kautta (ks. yleiskatsaukset Mosmann ja Sad, 1996; Glimcher ja Murphy, 2000). Kun solu aktivoituu, sytokiinisignaalit, joita se ympäristöstään saa, ohjaavat solua erilaistumaan tietyksi T-auttajasolun alatyypiksi. Th1-solut tunnistetaan erityisesti niiden runsaan interferoni- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) -tuoton perusteella (Gajewski ym., 1988). Th2-solut tuottavat pieniä määriä useita sytokiineja, kuten IL4, IL5, IL10 ja IL13 (ks. yleiskatsaus Glimcher ja Murphy, 2000).

Th0-solut muistuttavat sytokiinituotannoltaan enemmän Th1-soluja kuin Th2-soluja (Ariga ym., 2007). Tärkein Th1-suuntaan ohjaavista sytokiineistä on IL12 (Manetti ym., 1994), kun taas IL4 signaalit ohjaavat solun erilaistumista Th2-suuntaan (Swain ym., 1990). Kumpikin sytokiini aktivoi spesifiset reseptorit solun pinnalla ja vaikuttaa kohdegeeniensä ilmenemiseen solunsisäisen Jak-STAT (Janus-kinaasi ja Signal Transducer and Activator of Transcription) signalointireitin kautta (Bacon ym., 1995). Samalla kun erilaistuva solu alkaa tuottaa alatyypilleen ominaisia sytokiineja, se estää toiselle alatyypille tyypillisten sytokiinien tuottoa (ks. yleiskatsaus Glimcher ja Murphy, 2000). Solun itsensä tuottamat sytokiinit toimivat autokriinisesti voimistaen erilaistumissignaalia (ks. yleiskatsaus Abbas ym., 1996).

Erilaistuvassa Th-solussa tapahtuu useita muutoksia. Naiivi Thp-solu ei ilmennä pinnallaan IL12-reseptoria, jonka kautta IL12 voimistaa solun erilaistumista Th1-suuntaan. Kun solu aktivoituu, se alkaa tuottaa IL12-reseptorin kumpaakin alayksikköä,  $\beta 1$ :tä ja  $\beta 2$ :ta. IL12-signaalit välitetään solussa STAT4:n kautta. Erityisesti IL12R $\beta 2$ -ketju on tärkeä IL12-signaloinnissa ja siitä syystä solun erilaistuessa Th2-suuntaan, IL4 estää IL12R $\beta 2$ :n ilmenemisen (Presky ym., 1996; Szabo ym., 1997; Rogge ym., 1999). IL12:n lisäksi Th1-solujen itsensäkin tuottama IFN $\gamma$  ohjaa T-auttajasoluja Th1-suuntaan. IFN $\gamma$ -signaalit kulkevat STAT1:n kautta ja signaalit estävät IL4-signaloinnin Th1-soluissa (Szabo ym., 1997; Ramana ym., 2000). Jo varhain Th1-solujen erilaistumisprosessin alussa IL12-signaalit aktivoivat transkriptiotekijä T-betin, joka vuorostaan säätelee useiden Th1-erilaistumiseen vaikuttavien geenien ilmenemistä (Szabo ym., 2000). T-bet ohjaa Th1-solujen erilaistumista säätelemällä mm. IL12-reseptorin ilmenemistä ja IFN $\gamma$ -tuottoa (Mullen ym., 2001; Szabo ym., 2002; Afkarian ym., 2002; Ariga ym., 2007).

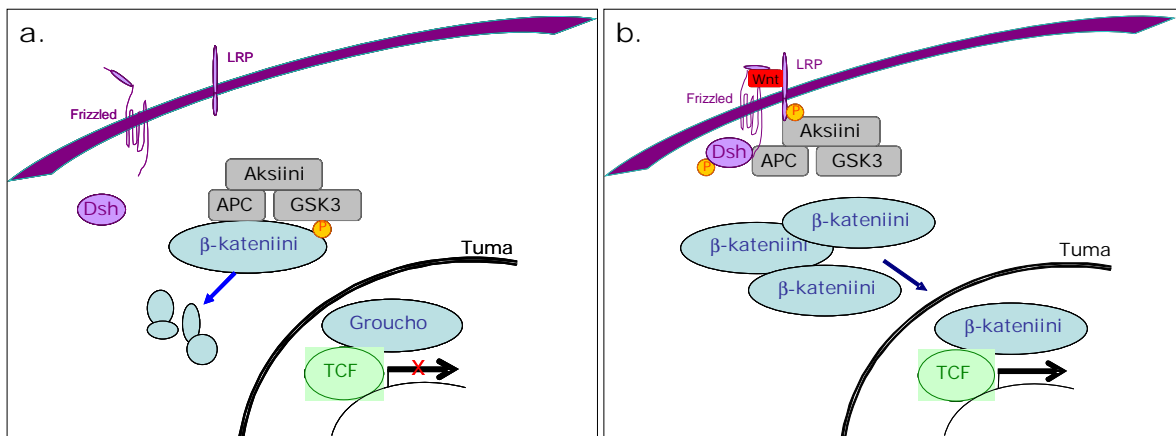
Th2-soluissa STAT6 toimii IL4-signaalin välittäjänä ja on välttämätön Th2-solujen erilaistumiselle (Schindler ym., 1994; Kaplan ym., 1996). Th2-suuntaan erilaistuvat T-auttajasolut ilmentävät runsaasti GATA-3:a. GATA-3:lla on Th2-soluissa yhtä tärkeä rooli kuin T-betillä Th1-soluissa; se säätelee Th2-sytokiinien ja muiden tärkeiden geenien ilmenemisestä. Jos solut erilaistuvat Th1-suuntaan, GATA-3:n ilmeneminen soluissa vähenee (Zheng ja Flavell, 1997).

## 1.2. Transkriptiotekijä TCF7

TCF7-transkriptiotekijä löydettiin alun perin tutkittaessa CD3ε:iin sitoutuvia proteiineja (Oosterwegel ym., 1991; Van de Wetering ym., 1991). Transkriptiotekijä tunnetaan myös nimellä TCF-1 (T cell factor 1), joka aikuisella nisäkkäällä ilmenee ainoastaan T-soluissa. TCF7, kuten myös muut TCF/LEF – perheen proteiinit, on tärkeä osa Wnt-signaalien välitystreittiä.

### 1.2.1. Wnt-signalointi

Nimi 'Wnt' ei itsessään ole lyhenne mistään tietyistä sanasta. Se on yhdistelmä kahdesta erikseen löydetystä proteiinista, joiden homologia havaittiin myöhemmin; banaanikärpäsen kehityksessä tärkeä wingless (wg) ja hiiren proto-onkogeeni int-1 (Novak ym., 1999). Wnt-signaalit voivat kulkea joko kanonista tai ei-kanonista signaalinvälitystreittiä pitkiä. TCF/LEF -transkriptiotekijät ovat osa kanonista Wnt-signaalintireittiä (ks. kuva 1), joka on tärkeä mm. solun kohtalon määrittämisessä (Kato ym., 2007).



**Kuva 1. Wnt-signalointi.** **a.** Wnt-signaalin puuttuessa aksiini, glykogeenisyntaasikinaasi-3β:n (GSK3) ja APC:n (adenomatous polyposis coli) muodostama proteiini-kompleksi fosforyloi soluliman β-kateniiniin, joka näin ollen tulee hajotetuksi. Tumassa transkriptiota estävä Groucho pääsee sitoutumaan TCF/LEF – perheen transkriptiotekijöihin. **b.** Kun Wnt-proteiini sitoutuu Frizzledin ja LRP:n (low-density lipoprotein receptor related protein) muodostamaan reseptorikompleksiin, aktivoitunut Dsh (Dishevelled) estää β-kateniinia fosforyloivan proteiini-kompleksin toiminnan. Tämän seurauksena stabiilia β-kateniinia kertyy sytoplasmiaan, josta se siirtyä tumaan ja korvaa transkriptiota estävän Grouchon. Yhdessä TCF-transkriptiotekijän kanssa β-kateniini aktivoi Wnt-kohdegeenien transkription. Kuva on tehty yleiskatsauksen Gordon ja Nusse (2006) mukaan.

TCF/LEF - perheen proteiineissa on DNA:ta sitova alue, HMG-box (high mobility group), joka tunnistaa tietyn kohdan DNA:ssa. HMG-box taivuttaa DNA-nauhaa sitouduttuaan siihen ja DNA:n taipumisen arvellaan vaikuttavan muiden transkriptiotekijöiden sitoutumiseen (Atcha ym., 2007; van Noort ym., 2002). Solussa TCF/LEF – proteiinit sijaitsevat aina tumassa (Castrop ym., 1995). TCF/LEF-proteiinit sitoutuvat DNA:han spesifisesti ja voivat aktivoida Wnt-kohdegeenien transkription yhdessä  $\beta$ -kateniinin kanssa, jolloin  $\beta$ -kateniini toimii transkription aktivoijana (van de Wetering ym., 2002).

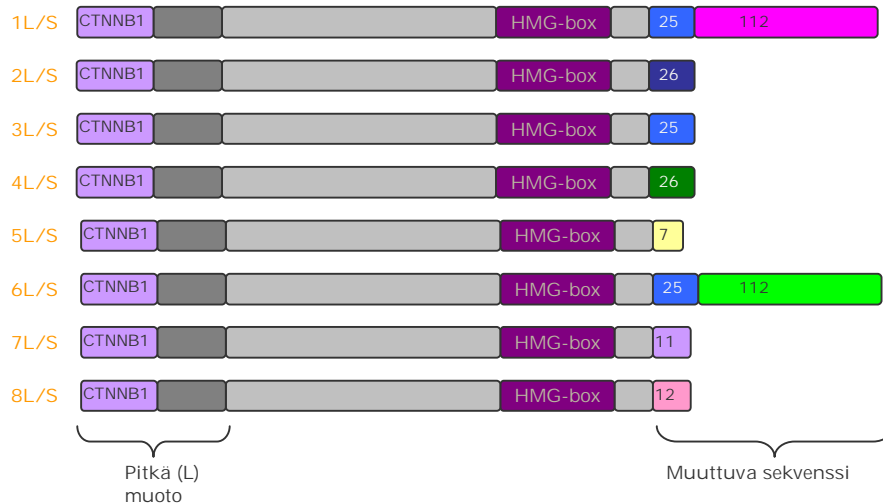
Wnt-signaalit ovat tärkeitä alkion kehityksessä ja erilaisten solujen, mm. T-solujen kypsymisessä. Wnt-signaalit säätelevät mm.  $\beta$ -kateniinin ja TCF-proteiinien kautta *Xenopus laevis* – sammakon alkion selkä-vatsa -akselin muodostumista (Brannon ym., 1997). Cavallo ym. (1998) tutkivat Armadillon ( $\beta$ -kateniinia vastaava proteiini kärpäsessä) ja TCF-proteiinin toimintaa ja huomasivat, että mikäli Armadillo ei pääse siirtymään solulimasta tumaan, TCF-proteiini on sitoutuneena Groucho-proteiiniin ja transkriptio estyy. Siispä TCF-proteiinit voivat aktivoida transkriptiota joissain soluissa ja estää sitä toisissa.

### 1.2.2. TCF/LEF-proteiinien monimuotoisuus

Ensimmäiset proteiinit, jotka TCF/LEF-perheestä tunnistettiin, olivat TCF7 ja LEF1. Ne ovat erittäin homologisia ja tunnistavat samat kohdat DNA:ssa (Van de Wetering ym., 1992). Vaikka TCF7:n ja LEF1:n homologia on yli 90 %, ne ilmenevät eri lailla eri kudoksissa (ks. yleiskatsaus Schilham ja Clevers, 1998). Ihmisellä ja muilla nisäkkäillä TCF7 ja LEF1 ovat kaksi eri proteiinia, mutta esimerkiksi kanalla on vain TCF7 (Gastrop ym., 1992). Kanan TCF7-proteiinin N-terminaalinen pää muistuttaa enemmän nisäkkäiden LEF1:tä kuin TCF7:ää, kun taas C-terminaalinen pää muistuttaa nisäkkäiden TCF7:ää. TCF7 ja LEF1 ovatkin todennäköisesti syntyneet geenin kahdentumisen seurauksena.

Kun TCF7 löydettiin, siitä tunnistettiin aluksi vain kolme eri isoformia, mutta myöhemmin vaihtoehtoisia muotoja löydettiin lisää (Oosterwegel ym., 1991; Van de Wetering ym., 1991; Mayer ym., 1995; Van de Wetering ym., 1996). Eri isoformit syntyvät samasta geenistä vaihtoehtoisen silmukoinnin avulla. TCF7-isoformit eroavat toisistaan proteiinin C-terminaalisisessa olevan sekvenssin suhteen, joka on lähellä proteiinin DNA:ta sitovaa koh-

taa (ks. kuva 2). Onkin arveltu, että nämä eroavat sekvenssit saattavat tarjota sitoutumis-kohtia toisille proteiineille ja näin ollen säätelisivät tiettyjen kohdegeenien ilmenemistä (Van de Wetering ym., 1991; Atcha ym., 2007).



**Kuva 2. TCF7:n eri proteiini-isoformit.** Kuva on tehty UniprotKB -proteiinitietokannan tietojen perusteella. Proteiinin runko-osa on pituudeltaan 243 aminohappoa (ah) ja pitkien muotojen N-terminaalisen osan pituus on 115 ah. C-terminaalisen pään eroavat sekvenssit vaihtelevat pituudeltaan 7 – 137 ah.

Vaihtoehtoisen silmukoinnin lisäksi TCF7:llä on kaksi vaihtoehtoista promoottoria, joiden ansiosta se voi tuottaa kustakin isoformista joko lyhyen tai pitkän muodon (ks. yleiskatsaus Van Noort ja Clevers, 2002). Pitkissä muodoissa on N-terminaalisisessa päässä  $\beta$ -kateniinia sitova alue (CTNNB1), joka puuttuu lyhyistä muodoista. On esitetty, että TCF7:n pitkät muodot toimisivat kohdegeenien transkription aktivoijina ja lyhyet estäjinä (Mayer ym., 1995; Bienz, 1998; Hovanes ym., 2001).

### 1.2.3. TCF7-transkriptiotekijän tehtävät

Aikusella nisäkkäällä TCF7 ilmenee pääasiassa T-soluissa, mutta alkionkehityksen aikana myös useassa muussa kudoksessa (Oosterwegel ym., 1993). Syntymän aikoihin TCF7:n ilmeneminen kudoksissa sammuu, T-soluja lukuun ottamatta. Vaikka TCF7:n roolia nisäkkäiden alkionkehityksen aikana on tutkittu lähinnä hiirissä, Castrop ym. (1995) esittävät, että myös ihmisen alkionkehityksen aikana TCF7:llä on suuri merkitys lymfosyyttien, sekä

muiden solujen ja kudosten kehityksessä. Wnt-signaalit ohjaavat useiden varhaisolupopulaatioiden henkiinjäämistä, jakautumista ja levittäytymistä (Mulroy ym., 2002).

Wnt-signaaloinnin on havaittu olevan tärkeää T-solujen kehittymiselle, etenkin varhaisissa kehitysvaiheissa, ja vaikuttavan erityisesti solumäärän kasvuun (Staal ym., 2001; Ioannidis ym., 2001; Goux ym., 2005). Wnt-kohdegeenien transkription aktivoimiseen tarvitaan sekä TCF7 että  $\beta$ -kateniini eli ns. pitkät,  $\beta$ -kateniinia sitovat muodot TCF7:stä on välttämättömiä normaalin T-solukehityksen kannalta. Wnt-signaali näyttäisi vaikuttavan myös perifeeristen T-solujen erilaistumiseen. Verbeek ym. (1995) huomasivat, että mutaatiot hiiren TCF7-geenissä hidastavat lymfosyyttien kypsymistä ja T-solujen määrä jää selvästi normaalia pienemmäksi. Lisäksi TCF7-poistogeenisten hiirten T-solut ovat normaalia hauraampia (Ioannidis ym., 2001). T-soluja siis kypsyy jonkin verran TCF7:n puuttuessa. Okamura ym. (1998) havaitsivat, että LEF1 voi korvata osittain TCF7:n tehtävät T-solujen kehityksessä. T-solujen määrä saattaa jäädä pienemmäksi ja syntyvät solut olla hauraampia, koska LEF1 ilmenee kateenkorvassa paljon vähemmän kuin TCF7. Jos mutaatioita on sekä TCF7:ssä että LEF1:ssä, T-solujen kypsyminen heikkenee selvästi.

TCF7:n ja toisen transkriptiotekijän, GATA-3:n, rooli T-solujen kehityksessä on merkittävä (Hattori ym., 1996; Ting ym., 1996; Tydell ym., 2007). Aivan T-solujen kehityksen alussa ne toimivat Notch-signaaloinnin kohdegeeneinä ja ohjelmoivat epäkypsät solut T-solukehityssuuntaan (Anderson, 2006). Myöhemmissä kehitysvaiheissa TCF7 ja GATA-3 välittävät Wnt-signaaleja. TCF7:n rooli näyttää liittyvän enemmän solumäärän kasvuun ja solujen levittäytymiseen kuin solujen varsinaiseen kypsymiseen (Schilham ym., 1998). Useassa vaiheessa T-solukehityksen aikana vain pieni määrä soluista valikoituu ja on tärkeää, että valitut solut jakautuvat nopeasti ja levittäytyvät (ks. yleiskatsaukset Anderson, 2006; Rothenberg ja Taghon, 2005). TCF7:n ilmentymisessä on havaittavissa eroja T-solujen kehitysvaiheesta riippuen (Verbeek ym., 1995). Weerkamp ym. (2006) havaitsivat, että vaikka ilmenevän TCF7:n kokonaismäärä on suunnilleen sama kaikissa T-solun kehitystasteissa, pitkien (aktivoivien) ja lyhyiden (estävien) muotojen suhde muuttuu. Aktivoivien ja estävien muotojen suhde muuttuu myös T-solujen aktivoitumisen seurauksena (Willinger ym., 2006).



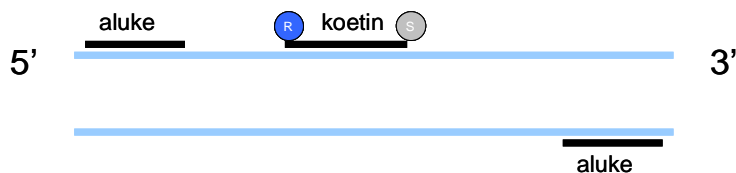
### 1.3. Geenien ilmenemisen mittaaminen

Monet tekijät vaikuttavat geenien ilmenemiseen. Samasta geenistä voidaan tuottaa useita erilaisia mRNA-molekyylejä ja samasta mRNA-molekyylistä voidaan tehdä useita erilaisia proteiineja. On arvioitu, että jopa 50 %:lla ihmisen geneeistä on vaihtoehtoisia promoottoreita (ks Kimura ym., 2006) ja peräti 80 %:lla vaihtoehtoista silmukoimista (ks. Kampa ym., 2004). Transkriptiotekijä TCF7 on hyvä esimerkki tästä monimuotoisuudesta. TCF7:llä tiedetään olevan kaksi vaihtoehtoista promoottoria (ks. yleiskatsaus Van Noort ja Clevers, 2002) ja useita vaihtoehtoisia mRNAita (ks. Van de Wetering ym., 1996). TCF7, kuten monet muut transkriptiotekijät, voivat joko aktivoida tai estää transkriptiota ja vastaavasti transkriptiotekijöiden ilmestyminen vaikuttaa erilaisten säätelyalueiden kautta (ks. Mayer ym., 1995; yleiskatsaus Farnham, 2009). Geenien transkription estämiseen tai aktivoimiseen voi vaikuttaa myös DNA-metylaatio. Ivescu ym. (2007) havaitsivat useiden transkriptiotekijöiden, kuten TCF7, GATA-3 ja T-bet, DNA-metylaatioissa eroja solujen eri kypsyamis- ja kehitysvaiheiden välillä.

Tavallisimmat menetelmät geenien ilmenemistä tutkittaessa ovat mikrosirut ja reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RT-qPCR). Mikrosiruissa kiinteälle alustalle, kuten lasille, on kiinnitetty tavallisesti kymmeniä tuhansia 25 – 60 emäsparia pitkiä oligonukleotideja, joista kukin tunnistaa spesifisesti tietyn komplementaarisen DNA (cDNA)- tai cRNA -molekyylin. Nämä cDNA- tai cRNA-molekyylit on käännetty mRNA:sta. Kun näytteessä oleva cDNA tai cRNA on sitoutunut mikrosiruun kiinnitettyyn oligonukleotidiin, näyte leimataan fluoresoivalla värillä. Sitoutuneen näytteen määrää voidaan mitata tarkalla skannerilla ja arvioida eroja tietyn mRNA:n määrässä eri näytteiden välillä.

RT-qPCR -tekniikalla mitataan myös tietyn mRNA:n määrää, mutta yleensä vain yhtä mRNA:ta kerrallaan. PCR:ta varten näyte käännetään yksijuosteiseksi cDNA:ksi. RT-qPCR:ssä mRNA:n määrän havaitseminen perustuu reaktioon lisättyyn fluoresoivaan väriin, esimerkiksi SYBRGreen, joka sitoutuu kaksinauhaiseen PCR-tuotteeseen. Ongelma tällaisen värin käytössä on, että väri sitoutuu kaikkeen kaksinauhaiseen DNA:han, eikä mitattava signaali välttämättä ole mRNA:lle spesifinen. Spesifisyyttä voidaan parantaa käyttämällä leimattuja koettimia, joissa koettimen 5' päähän on kiinnitetty fluoresoiva

reportterileima ja 3' päähän ns. sammuttajaleima (ks. kuva 3). Koettimen ollessa kokonainen, koettimen päissä olevat leimat ovat lähellä toisiaan ja fluoresenssiresonanssienergian siirron (FRET) vuoksi sammuttajaleima estää reportterileiman fluoresenssin emissiota. PCR-reaktiossa koetin sitoutuu spesifisesti kohdesekvenssiinsä alukkeiden väliin ja DNA polymeraasin 5' nukleaasiaktiivisuus pilkkoo koettimen monistumisen aikana. Koettimen pilkkoutumisen johdosta reportterileima joutuu kauemmas sammuttajaleimasta ja reportterileiman signaali kasvaa. Reportterileiman signaali kertoo, paljonko tiettyä mRNA:ta näytteessä on. Mitä aiemmin signaali nousee tietyn kynnyksarvon yli, sitä enemmän kyseistä mRNA:ta näytteessä on.



**Kuva 3. TaqMan-kemia.** Leimattu koetin sitoutuu spesifisesti cDNA:han alukkeiden väliin. Kuva on tehty Applied Biosystems'n kemiaoppaan (Chemistry guide) mukaan.

#### 1.4. RNA-interferenssi

Tutkiessaan siirtogeenisiä kasveja, tutkijat huomasivat siirrettävän geenin ja isäntäkasvin homologisen geenin hiljentävän toisinaan toistensa ekspressiota (Vaucheret ym., 1998). Ilmiötä alettiin kutsua RNA-interferenssiksi (RNAi). Kasvien lisäksi ilmiö havaittiin myös mm. sienissä ja selkärangattomissa eläimissä, mutta nisäkässoluissa havaittiin voimakas vastareaktio siirrettävälle geneettiselle materiaalille RNAi:n sijaan (Fire, 1999). Yli 30 emästä pitkät kaksinauhaiset RNA-säikeet laukaisevat nisäkässoluissa ns. interferonivasteen, joka on solun normaali reaktio viruksia ja transposoneita vastaan (Elbashir ym., 2001b). Interferonivasteen seurauksena solussa on havaittavissa epäspesifistä mRNA:iden hajottamista sekä proteiinisynteesin lopettamista (Sui ym., 2002).

RNAi:ä tutkiessaan Elbashir ym. (2001a) havaitsivat, että myös lyhyemmät, 21 emästä pitkät RNA-säikeet, riittävät aikaansaamaan RNAi:n, mutta eivät laukaise interferonivastetta. Näitä lyhyitä RNA-pätkiä kutsutaan siRNA:iksi (small interfering RNA). siRNA-molekyylejä voidaan hyödyntää tutkimuksessa hiljentämään haluttujen geenien ilmenemis-

tä. Jotkut siRNA-sekvenssit hiljentävät kohdegeenin ilmenemisen tehokkaammin kuin toiset. Usein on tarpeen suunnitella useampi siRNA kohdegeenilleen ja testata niiden tehokkuus (Amarzguioui ym., 2005; Leung ja Whittaker, 2005). Lisäksi on mahdollista, että suunniteltu siRNA hiljentää useamman kuin yhden geenin ilmenemisen (Lee ym., 2009).

Jotta geenien hiljeneminen saadaan aikaan, siRNA-molekyylit pitää saada kohdesolujen sisälle. Tämä onnistuu esimerkiksi transfektion avulla. Transfektio on menetelmä, jolla nukleiinihappoja siirretään solun sisään esimerkiksi lyhyiden sähköimpulssien (elektroporaatio) avulla. Primaarisoluja on kuitenkin hankala saada transfektoitua perinteisellä elektroporaatiolla, koska siirretty nukleiinihappo ei välttämättä siirry solulimasta tumaan. Transfektio menetelmää, jossa nukleehapot pyritään siirtämään suoraan tumaan, kutsutaan nukleofektiksi. Nukleofektioilla hankaliinkin soluihin saadaan siirrettyä DNA:ta tehokkaammin kuin perinteisellä elektroporaatiolla (Martinet ym., 2003; Tahvanainen ym., 2006; Zaragosi ym., 2007).

## 2. Tutkimuksen tarkoitus

TCF7:n on havaittu ilmenevän enemmän ihmisen Th1- kuin Th2-soluissa 48 h kuluttua T-solujen aktivaatiosta (Lund ym., 2005). Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää onko TCF7-transkriptiotekijällä vaikutusta T-auttajasolujen erilaistumiseen.

## 3. Materiaalit ja menetelmät

### 3.1. TCF7:n 2S- ja 2L-muotojen kloonaus

Kahdesta TCF7-isoformista oli tarkoitus kloonata yliekspressiovektori, joiden avulla voitaisiin nähdä tietyn isoformin normaalia suuremman ilmenemisen vaikutus T-auttajasolujen erilaistumiseen.

#### 3.1.1. TCF7:n 2S ja 2L muotojen monistus PCR:llä

Kloonaus aloitettiin monistamalla tiettyä TCF7-muotoa PCR:n avulla. Templaattina käytettiin cDNA:ta, joka oli tehty naiiveista T-auttajasoluista eristetystä RNA:sta. RNA eristettiin soluista Qiagenin RNeasy-kitillä valmistajan ohjeen mukaan (Qiagen, Saksa) ja lisäksi tehtiin ohjeessa kuvattu ylimääräinen DNAasi-vaihe (RNase-free DNase Set, Qiagen, Saksa). cDNA-synteesi tehtiin 500 ng:sta RNA:ta Superscript II – kitillä (Invitrogen, Yhdysvallat) valmistajan ohjeen mukaan. Alukkeena synteesissä käytettiin oligo dT:tä (Invitrogen, Yhdysvallat). PCR-ajot tehtiin Tetrad – laitteella (MJ Research, Yhdysvallat). Reaktiutilavuutena PCR:ssä käytettiin 50 µl:aa:

- 8,5 µl vettä
- 10 µl 5x Phusion HF buffer (Finnzymes, Suomi)
- 1 µl dNTP-laimennos 10 mM (Promega, Yhdysvallat)
- 15 µl Betaiini 5 M
- 5 µl Cresol Red 2 mM
- 2,5 µl 5' aluke, 10 µM
- 2,5 µl 3' aluke, 10 µM
- 0,5 µl Phusion DNA-polymeraasi (Finnzymes, Suomi)
- 5 µl cDNA

2S-muotoa monistettaessa näytteitä inkuboitiin ensin 30 s 98 °C:ssa, jonka jälkeen toistettiin 30 kierrosta 10 s 98 °C:ssa, 20 s 46 °C:ssa ja 30 s 72 °C:ssa. Lopuksi näytteitä inkuboitiin vielä 10 min 72 °C:ssa. Monistettaessa 2L-muotoa PCR-ohjelma oli muuten samanlainen, mutta sitoutumisvaiheessa lämpötilana käytettiin 46 °C:n sijaan 52 °C:tta. Koska TCF7 2S- ja 2L-muotojen 3' pää on sama, oli niillä yhteinen 3' aluke, 5'-CGCGCGGTCGACCTAGAGCACTGTCATCGGAAG-3'. Monistettaessa 2S-muotoa, käytetyn 5' alukkeen sekvenssi oli 5'-CGCGCGCTCGAGATGTACAAAGAGACCGTCTAC-3' ja 2L-muotoa monistettaessa käytettiin aluketta 5'-CGCGCGCTCGAGATGCCGCAGCTGGACTCCG-3'.

PCR-tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelille, josta PCR-tuotteet leikattiin irti ja niistä eristettiin DNA QIAquick Gel Extraction – kitillä (Qiagen, Saksa) valmistajan ohjeen mukaan. DNA eluointiin 30 µl:aan vettä.

### 3.1.2. PCR-tuotteiden liittäminen vektoriin ja transformaatio

Geeliltä eristetyt DNA:t ja pIRES-H2K-vektori käsiteltiin jokainen omassa putkessaan. Putkeen lisättiin:

- 43 µl veteen laimennettu vektori (2µg) tai
- 43 µl veteen laimennettu PCR-tuote
- 5 µl 10x digestiopuskuri B (Promega, Yhdysvallat)
- 2 µl *NheI*, 10 U/µl (Promega, Yhdysvallat)

Näytteitä inkuboitiin 2 tuntia 37 °C:ssa. Inkubaation jälkeen näytteet puhdistettiin QIAquick PCR Purification kitillä (Qiagen, Saksa) valmistajan ohjeen mukaan, mutta eluointi tehtiin 45 µl:aan vettä. Näytteisiin lisättiin 5 µl 10x digestiopuskuri D:tä (Promega, Yhdysvallat) ja 2 µl *Sall*-entsyymiä (Promega, Yhdysvallat) ja putkia inkuboitiin jälleen 2 tuntia 37 °C:ssa.

Digestioiden jälkeen näytteiden pitoisuus mitattiin spektrofotometrillä (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat). Vektorista (5780 emäsparia) otettiin 100 ng

ja insertistä (807 emäsparia) 56 ng ligaatiota varten ja putkeen lisättiin vielä 1 µl 10x ligatiopuskuria (Promega, Yhdysvallat) ja 1 µl T4 DNA ligaasia (Promega, Yhdysvallat). Lopuksi putkeen lisättiin vettä, niin että tilavuudeksi tuli 10 µl. Näytteitä inkuboitii yön yli 16 °C:ssa.

Ligaatioseokseen (10 µl) lisättiin 50 µl DH5α kompetentteja soluja ja putkia pidettiin jäällä 30 min. Tämän jälkeen soluille annettiin lämpöshokki eli ne laitettiin 2 minuutiksi 42 °C:een ja tämän jälkeen taas jäälle 5 minuutiksi. Putkiin lisättiin 300 µl LB-kasvatusliuosta ja inkuboitii tunti 37 °C:ssa. Solut sentrifugoitii lyhyesti ja putkista otettiin pois 200 µl kasvatusliuosta. Tämän jälkeen putkista otettiin 100 µl soluja 30 µg/ml kanamysiiniä sisältäville LB-maljoille ja annettiin kasvaa yön yli 37 °C:ssa.

### 3.1.3. Pesäke-PCR ja plasmidipuhdistus

Pesäke-PCR:ssä käytettiin samoja alukkeita kuin kohdassa 3.2.1. Templaattina käytettiin yhtä pesäkettä bakteerimaljalta (ks. 3.2.2). Reaktiutilavuutena käytettiin 25 µl:aa:

- 9,25 µl vettä
- 2,5 µl 10x PCR-reaktiopuskuria ilman MgCl<sub>2</sub>:a (Finnzymes, Suomi)
- 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> (Finnzymes, Suomi)
- 0,5 µl dNTP-laimennos, 10mM (Promega, Yhdysvallat)
- 7,5 µl Betaiini, 5 M
- 2,5 µl Cresol Red, 2 mM
- 0,5 µl 5' aluke, 10 µM
- 0,5 µl 3' aluke, 10 µM
- 1 µl Dynazyme II, 1 U/µl (Finnzymes, Suomi)

Näytteitä inkuboitii ensin 10 min 98 °C:ssa, jonka jälkeen toistettiin 30 kierrosta 30 s 94 °C:ssa, 30 s 46 °C:ssa ja 30 s 72 °C:ssa. Lopuksi näytteitä inkuboitii vielä 10 min 72 °C:ssa. Lopuksi PCR-tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelille, jotta nähtäisiin onko PCR toiminut ja onko PCR-tuote halutun pituista. Kun bakteerimaljalta oli otettu pesäke PCR:ää

varten, tikku jolla bakteeria siirrettiin PCR-putkeen, pudotettiin 5 ml LB-kasvatusliuosta ja 15 µl 30 µg/ml kanamysiiniä sisältävään putkeen. Putkia inkuboitii 37 °C:ssa yön yli.

Seuraavana päivänä bakteerikasvatuksesta otettiin steriilisti 700 µl kasvatusliuosta, lisättiin joukkoon 300 µl 50 % glyserolia ja pakastettiin -70 °C:ssa. Kasvatuksen loppuosasta eristettiin plasmidit Plasmid Mini – puhdistuskitillä (Qiagen, Saksa) valmistajan ohjeen mukaan.

## 3.2. 2D-immunoblottaus

Vaikka TCF7:n ilmenemistä on mitattu T-auttajasoluissa, ei tiedetä, mitkä isoformit soluissa ilmenevät ja ilmenevätkö Th1- ja Th2-soluissa eri isoformit. Päätimme kokeilla, pystyisimmekö erottamaan eri TCF7-muotoja 2D-immunoblottauksella. Siinä solut erotetaan sekä koon että isoelektrisen pisteen perusteella, eli sen pH:n, jossa proteiini ei liiku varaus- ta kohti. Isoelektrisessä fokuoinnissa ja 2D-geelin valmistuksessa ja ajossa tarvittavat reagenssit oli valmistanut Raija Andersen Turun Biotekniikan keskuksen proteomiikka-yksikössä.

### 3.2.1. Isoelektrinen fokuointi

2D-immunoblottauksessa käytetyt solut olivat BC-näytteistä eristettyjä CD4+ soluja (ks. 3.1.2). Putken pohjalle sentrifugoitujen solujen ( $20 \times 10^6$ ) päälle lisättiin 100 µl hajotuspuskuria (40 mM Trizma base, 2 % Nonidet P 40, 4 % 3-[(3-kolamidopropyli)dimetyyliammonio]-1-propaanisulfonaatti, 200 mM ditiotreitoli ja 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1500 U endonukleaasia, 5 µg RNAasia ja 5 µl proteaasi-inhibiittoria (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-free, Roche, Saksa), joka oli valmistettu liuottamalla yksi tabletti 500 µl vettä. Soluja inkuboitii 37 °C:ssa 30 minuuttia sekoittaen näytteitä aina välillä. Inkubaation jälkeen näytteiden annettiin viilentyä huoneenlämpöisiksi ja niihin lisättiin 300 µl rehydraatiopuskuria (8M Urea, 2 % 3-[(3-kolamidopropyli)dimetyyliammonio]-1-propaanisulfonaatti, 10 mM ditioerytritol, 2 % amfolyytti, 0.8 % bromifenolisinen), se-



koitettiin ja annettiin seistä huoneenlämmössä 20 min. Tämän jälkeen solut sentrifugoitiin putken pohjalle 20 min. Näyte pipetoitiin sakkaa lukuun ottamatta liuskakaukaloon ja 18cm pitkä geeliliuska (Immobiline DryStrip pH 3-10L, Amersham Pharmacia Biotech, Yhdysvallat) asetettiin geelipuoli alaspäin näytteen päälle. Liuskan päälle pipetoitiin 2,2 ml parafiiniöljyä ja asetettiin kaukalon kansi paikoilleen. Kaukalot asetettiin IPGphor-laitteeseen (Amersham Pharmacia Biotech, Yhdysvallat) niin, että kaukalon toinen pää on anodin ja toinen katodin päällä ja käynnistettiin ajo yön yli: 20 min 30 V, 30 min 100 V, 30 min 600 V, 30 min 1500 V ja 2 h 1500 - 8000 V ja loppuaika 8000 V.

Seuraavana aamuna laitettiin 10 ml tasapainotusliuosta (6 M Urea, 50 mM Tris-HCl, 2 % natriumdodekyylisulfaatti (SDS), 20 % glyseroli ja 0,2 % bromifenolisininen) kahteen putkeen, joista toiseen lisättiin 10 mg/ml ditiotreitolia ja toiseen 25 mg/ml jodoasetamidia. Liuska nostettiin kaukalosta ja nostettiin tasapainotusliuosta ja ditiotreitolia sisältävään putkeen. Putkea ravisteltiin huoneenlämmössä 15 minuuttia, jonka jälkeen liuska siirrettiin tasapainotusliuosta ja jodoasetamidia sisältävään putkeen ja inkuboitiin vielä 15 minuuttia. Ennen geelille lataamista, liuska kuivattiin varovasti painamalla sitä geelipuoli alaspäin kostutettua Whatman-paperia vasten.

### 3.2.2. SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE)

Valmistettiin 50 ml 12 % SDS-PAGE geeliä:

40% Akryyliamidiliuos	15 ml
1,5 M Tris-HCl	12,5 ml
10 % SDS	500 µl
10% ammoniumpersulfaatti	250 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyylietyliinidiamiini)	25 µl
vesi	21,75 ml

Geeli valettiin kahden erikorkuisen lasilevyn väliin jättäen se yläosasta n. 3 cm vajaaksi. Geelin päälle pipetoitiin varovasti vettä. Kun geeli oli jähmettynyt, kaadettiin vesi pois ja

geelin päälle pipetoitiin kerros latausgeeliä. Latausgeelin toiseen reunaan jätettiin kaivo proteiinistandardia:

40 % Akryliamidiliuos	500 µl
0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
10 % ammoniumpersulfaatti	25 µl
TEMED	5 µl
vesi	3,2 ml

Kun latausgeelikin oli jähmettynyt, nostettiin geeli ajotankkiin, johon kaadettiin 2 l Laemmliä (28,8 g glysiiniä, 2 g SDS ja 6 g Tris Base). Fokusoitu geeliliuska asetettiin latausgeeliin ja pipetoitiin 10 µl proteiinistandardia (Prestained SDS-PAGE Broad Range standard, BioRad, Yhdysvallat) kaivoon. Geeliä ajettiin yön yli 6 mA.

### 3.2.3. Immunoblottaus

Kun 2D-geeli oli ajettu, siirrettiin siltä proteiinit PVDF-siirtomembraanille (polyvinyyli-deenifluoridi) puolikuivan blottauksen avulla. Ensin PVDF-membraani (Millipore, Yhdysvallat) käsiteltiin metanolilla 10 s ja sen jälkeen huuhdeltiin vedellä 2 min. Tämän jälkeen siirtopuskuriin (25 mM Tris Base, 0,2 M glysiini ja 20 % MeOH) kastellut Whatman-paperit, PVDF-membraani ja geeli kasattiin siirtolaitteen (Bio-Rad, Yhdysvallat) päälle ja pino kostutettiin siirtopuskurilla. Siirto tehtiin 400 mA 1 h.

Kun siirto oli tehty, membraani siirrettiin varovasti pesuputkeen ja käsiteltiin TCF7 – vasta-aineella (klooni 7H3, Upstate, Yhdysvallat) valmistajan ohjeen mukaan. Sekundaarivasta-aineena käytettiin vuohen anti-hiiri HRP-konjugoitua IgG – vasta-ainetta (Santa Cruz, Yhdysvallat). Raija Andersen teki geelille hopeavärjäyksen, jotta nähtäisiin miten hyvin proteiinit ovat siirtyneet membraanille. Siirron onnistumista kontrolloitiin β-aktiini – vasta-aineella (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat), jossa sekundaarivasta-aineena käytettiin vuohen

anti-hiiri HRP-konjugoitua IgG – vasta-ainetta (Santa Cruz, Yhdysvallat). Proteiinien visualisointiin käytettiin ECL Plus – reagensseja (Amersham Pharmacia Biotech, Yhdysvallat).

### 3.3. Nukleofektiokasvatukset

#### 3.3.1. Plasmidien eristys

Työssä tarvittavat plasmidikonstruktit, pSUPER-scramble-H2K<sup>k</sup> ja pSUPER-H2K<sup>k</sup>-TCF7-siRNA#2, on kloonattu professori Riitta Lahesmaan laboratoriossa aiemmin. Nukleofekti-  
oita varten otin kyseisiä plasmideja sisältäviä bakteereja kasvamaan 100 µg/ml ampisilliiniä sisältävälle maljalle kasvamaan yön yli 37 °C:ssa. Seuraavana päivänä yksi pesäke kutakin konstruktia sisältäviä bakteereja siirrettiin 10 ml:aan Luria-Bertani (LB) – kasvatusliuosta (Qbiogene), johon oli lisätty 100 µg/ml ampisilliiniä ja inkuboitin ravistelijassa 8 h 37 °C:ssa. Tämän jälkeen esikasvatukset siirrettiin 150 ml:aan 100 µg/ml ampisilliiniä sisältävään LB-kasvatusliuokseen ja inkuboitin ravistelijassa (230 kierrosta minuutissa) yön yli 37 °C:ssa. Plasmidit eristettiin kasvatuksista Plasmid Maxi – puhdistuskitin (Qiagen, Saksa) ohjeen mukaan. Eristetty DNA liuotettiin 400 µl:aan vettä ja näytteen pitoisuus ja puhtaus mitattiin spektrofotometrillä (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat).

#### 3.3.2. Solujen eristäminen

Tein yhteensä neljä nukleofektiokasvatusta käyttämällä ihmisen CD4<sup>+</sup> T-soluja, jotka oli eristetty joko BC (Buffy coat) -valmisteista (kasvatukset I – III) tai napaverestä (kasvatus IV). BC-näytteet tilattiin Suomen Punaisen Ristin Veripalvelusta. Napaveret kerättiin vastasyntyneiltä Turun yliopistollisessa keskussairaalassa.

CD4<sup>+</sup> -solujen eristäminen verinäytteistä aloitettiin Ficoll-Paque sentrifugoinnilla (Ficoll-Paque Research Grade, Amersham Pharmacia Biotech, Yhdysvallat). Näytteet laimennettiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS), BC-näytteet 1:4 ja napaveret 1:2, ja lai-

mennettu näyte kaadettiin varovasti putkeen, jossa oli 15 ml Ficoll-Paque -reagenssia. Solujen erottelun kannalta on tärkeää, etteivät Ficoll-Paque ja veri pääse sekoittumaan. Putkia sentrifugoitiin 1500 rpm 30 min. Ficoll-Paque -sentrifugoinnissa mononukleaariset solut jäävät tiheydensä ansiosta Ficoll-Paque- ja plasmakerroksen väliin, josta ne voidaan varovasti kerätä talteen. Punasolut aggregoituvat ja painuvat pohjaan sentrifugoinnin aikana ja myös granulositytit tiheämpinä soluina pääsevät kulkeutumaan Ficoll-Paque kerroksen läpi. T-auttajasolujen eristys tehtiin CD4-spesifisillä monoklonaalisilla vasta-aineilla päällystettyjen superparamagneettisten polystyreenihelmien avulla (CD4+ Isolation Kit, Invitrogen Dynal, Norja) valmistajan ohjeen mukaan. Vasta-aineet sitoutuvat soluihin, joiden pinnalla on CD4-molekyylit (lähinnä T-auttajasolut). Magneetin avulla näytteestä erotellaan vasta-aineen sitomat solut. Lopuksi solut irrotetaan helmistä DETACHaBEAD -vasta-aineella.

### 3.3.3. Nukleofektiot

Eristettyihin T-auttajasoluihin transfektoitiin nukleofektion avulla haluttu siRNA- tai scramble-sekvenssi. Nukleofektiokasvatuksissa I - III viisi miljoonaa BC-näytteestä eristettyä CD4-positiivista solua suspensoitiin 100 µl:aan Optimem-kasvatusliuosta (Gibco, Yhdysvallat), lisättiin 10 µg joko pSUPER-scramble-H2K<sup>k</sup>- tai pSUPER-H2K<sup>k</sup>-TCF7-siRNA#2 -plasmidikonstruktia. Osa soluista jätettiin nukleofektoimatta, jotta saataisiin kasvatukseen kontrolliksi ns. normaaleja soluja. Näitä normaaleja soluja kohdellaan muuten kuten nukleofektoituja soluja, mutta niille ei tehdä kuolleiden solujen poisto- eikä ja H2K<sup>k</sup>-positiivisten solujen rikastamisvaihetta (koska soluissa ei ole niitä). Nukleofektiokasvatuksessa IV neljä miljoonaa napaverestä eristettyä CD4-positiivista solua suspensoitiin 100 µl:aan Optimem-mediumia ja lisättiin 1,5 µg scramble-oligonukleotidia tai TCF7-siRNA -oligoa (Sigma Proligo, Ranska).

Solut ja siRNA pipetoitiin kyvetiin ja sille annettiin sähköpulsseja käyttämällä Nucleofector-laitteen ohjelmaa U-014 (Lonza (Amexa), Sveitsi). Tämän jälkeen kyvetit huuhdeltiin kahdesti 500 µl:lla 37 °C:ssa esilämmitettyä RPMI-1640 -kasvatusliuosta (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat), johon oli lisätty L-glutamiinia (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat), penisilliini-

streptomysiiniä (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat) ja 10 % vastasyntyneen naudan seerumia. Kun kaikki solut oli käsitelty, solut pipetoitiin 6-kuoppalevyille n. 4 ml/kuoppa. Nukleofektiokasvatuksissa I - III solut lepäsivät 37 °C:ssa soluviljelyinkubaattorissa 16 h ja nukleofektiokasvatusta IV 24 h ennen solujen rikastamista tai aktivointia.

### 3.3.4. Elävien H2K<sup>k</sup>-positiivisten solujen rikastaminen

Kun soluja nukleofektoidaan plasmidikonstruktilla, iso osa soluista kuolee. Kuolleet solut poistetaan ennen H2K<sup>k</sup>-positiivisten solujen rikastamista, koska kuolleista soluista vapautuvat aineet voivat häiritä elävien solujen kasvua. Solujen suuren hävikin takia myös lähtötilanteessa tarvitaan enemmän soluja ja siksi nukleofektiokasvatuksissa I - III on käytetty BC-näytteitä, joista saadaan paljon lähtömateriaalia. BC-näytteistä saatavat solut eivät ole pelkästään naiiveja, eli napaveren solut ovat parempia erilaistamiskasvatuksessa. siRNA-oligonukleotideja käytettäessä transfektiotehokkuus on parempi ja lisäksi solujen elinkyky säilyy melko hyvin, eli myös napaverestä saadut solut riittävät erilaistamiskasvatukseen.

Nukleofektiota seuraavana päivänä solut laskettiin ja nukleofektiokasvatuksista I - III otettiin ensin erilleen 300 000 solua/solutyyppi virtaussytometrianalyyysiin (ks. 3.3.5) ja lopulta poistettiin kuolleet solut MACS Dead Cell Removal – kitillä (Miltenyi Biotec, Saksa) valmistajan ohjeen mukaan. Eristyksessä kuolleet ja apoptoottiset leimataan magneettisilla helmillä ja leimatut solut sidotaan pylvääseen magneettitelineen avulla. Elävät solut pääsevät kulkemaan pylvään läpi. Pylvästä ja magneettitelinettä käytetään myös H2K<sup>k</sup>-positiivisten solujen eristämässä elävien solujen joukosta valmistajan ohjeen mukaan, kun H2K<sup>k</sup>-vasta-aineella päällystetyt helmet sitovat H2K<sup>k</sup>-positiiviset solut magneettiin. Eristyksen jälkeen soluista otettiin näyte virtaussytometrianalyyysiin (ks. 3.3.5). Loput solut laitettiin 6-kuoppalevyille  $2,5 \times 10^6$  solua/ml Ysselin kasvatusliuosta (Yssel et al., 1984), johon oli lisätty 1 % AB-seerumi (Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu) vielä runsaaksi vuorokaudeksi, jonka jälkeen käynnistettiin erilaistamiskasvatus (ks. 3.3.6).

### 3.3.5. Nukleofektiotehokkuuden ja elävyyden arvioiminen virtaussytometrillä

Ennen kuolleiden solujen poistamista ja H2K<sup>k</sup>-positiivisten solujen rikastamisen jälkeen otetut näytteet (ks. 3.3.4) pintavärjättiin virtaussytometrianalyysiä varten. Ensin solut sentrifugoitiin putken pohjaan 3 min 1600 rpm. Supernatantti poistettiin ja solut suspensoitiin 100 µl:aan PBS:ta. Ennen kuolleiden solujen poistoa otettuihin näytteisiin lisättiin 10 µl H2K<sup>k</sup>-FITC vasta-ainetta (Miltenyi Biotech, Saksa) ja rikastuksen jälkeen otettuihin näytteisiin lisättiin 10 µl Control-FITC vasta-ainetta (Miltenyi Biotech, Saksa). Osa nukleofektoimattomista soluista otettiin putkeen värjäämättömänä virtaussytometrin asetusten säätämistä varten. Näytteet sekoitettiin ja niitä inkuboitiin 10 min jäällä pimeässä. Solut pestiin 2 kertaa lisäämällä 1 ml PBS:ta, sentrifugoimalla 1600 rpm 3 min ja kaatamalla supernatantti pois. Lopuksi solut suspensoitiin 300 µl:aan PBS:ta, mitattiin FACSCalibur-virtaussytometrillä (BD Biosciences, Yhdysvallat) ja analysoitiin CellQuest-ohjelmistolla (BD Biosciences, Yhdysvallat).

### 3.3.6. Erilaistamiskasvatus

Erilaistamiskasvatuksessa eristetyt solut aktivoidaan CD3- ja CD28 -vasta-aineilla. Aktivaation lisäksi Th1-soluille lisätään IL12 ja Th2-soluille IL4. Th0-solut kasvatetaan neutraaleissa olosuhteissa, eli ne vain aktivoidaan. Nukleofektiokasvatuksissa I - III käytettiin 96-kuoppalevyä ja nukleofektiosolukasvatuksessa IV 24-kuoppalevyä. Solujen aktivoimisessa käytettävä CD3 vasta-aine (Immunotech, Ranska) laimennetaan PBS:een, niin että sen pitoisuus on 500 ng/ml, ja tätä pipetoidaan 32 µl 96-levyn kuoppaan ja 24-levyn kuoppaan 200 µl. Levyjä inkuboidaan 2 h 37 °C:ssa, jonka jälkeen kuopat pestään kaksi kertaa PBS:lla lisäämällä 96-levyn kuoppiin 200 µl ja 24-levyn kuoppiin 1 ml PBS:ta ja imemällä neste pois.

Nukleofektiokasvatuksissa I - III soluista otettiin nollahetken näytteet (0 h), jotka pestiin PBS:llä ja hajotettiin RNeasy-eristyskitin RLT-puskuriin (Qiagen, Saksa) vetämällä soluja muutaman kerran neulan läpi. Loput solut siirrettiin 6-kuoppalevyltä CD3 vasta-aineella

päällystettyihin kuoppiin 96-kuoppalevyllä 180 µl/kuoppa. Tämän jälkeen kuoppiin lisättiin 20 µl Ysselin mediumia, johon oli lisätty 5 µg/ml CD28 vasta-ainetta (Immunotech, Ranska) ja Th1-näytteisiin 25 ng/ml IL-12:ta (R&D Systems, Yhdysvallat) ja Th2-näytteisiin 100 ng/ml IL-4:ää (R&D Systems, Yhdysvallat).

Nukleofektiokasvatuksen IV solut kerättiin 24 h tunnin jälkeen nukleofektiosta 6-kuoppalevyllä ja sentrifugoitiin. Vanha kasvatusliuos kaadettiin pois ja solut suspensoitiin Ysselin kasvatusliuokseen ja laskettiin. Soluista otettiin 0h näytteet, jotka käsiteltiin kuten nukleofektiokasvatuksissa I - III. Loput solut laimennettiin Ysselin mediumiin  $1,5 \times 10^6$ /ml ja lisättiin anti-CD28 500 ng/ml. Tämän jälkeen solut jaettiin 3 osaan, joista yhteen lisättiin IL-12:ta 2,5 ng/ml (Th1-solut), toiseen IL-4:ää 10 ng/ml (Th2-solut) ja kolmanteen ei lisätty sytokiineja (Th0-solut). Solut pipetoitiin 24-kuoppalevyllä 1 ml/kuoppa.

Kasvatuksista kerättiin näytteitä 24 h, 48 h tai 7 päivän jälkeen. Kunkin kasvatuksen aikapisteet on kerrottu taulukossa 1. Nukleofektiokasvatuksissa II ja III 48 tunnin jälkeen kuopista otettiin varovasti pois 75 µl kasvatusliuosta (varoen kuopan pohjalle painuneita soluja) ja lisättiin 100 µl tuoretta Ysselin kasvatusliuosta, jossa oli 40 U/ml IL-2:ta (R&D Systems, Yhdysvallat) ja samat sytokiiniolosuhteet kuin kasvatuksen alussa. Nukleofektiokasvatuksessa IV kuopista otettiin 48 h jälkeen pois 500 µl kasvatusliuosta ja lisättiin 500 µl uutta, johon oli lisätty 40 U/ml IL-2:ta ja samat sytokiinit kuin kasvatuksen alussa. Mikäli kuoppa alkoi olla liian täynnä soluja, osa soluista siirrettiin uudelle kuopalle ja kuoppiin lisättiin tuoretta Ysselin kasvatusliuosta, johon oli lisätty tarvittavat sytokiinit (IL-2 ja IL-12 tai IL-4).

**Taulukko 1. Yhteenveto nukleofektiokasvatuksista.** Näytteryhmäjaottelussa scramble tarkoittaa nukleofektoituja soluja, joissa on spesifisen siRNA:n sijaan käytetty sekvenssiä joka ei aiheuta geenin hiljenemistä. T2.1 ja TCF7/1 ja TCF7/3 ovat eri siRNA-konstrukteja, jotka hiljentävät TCF7:n ilmenemistä. Ei NF – solut ovat nukleofektoimattomia soluja, jotka toimivat kasvatuksessa kontrollisoluina.

	<b>Nukleofektio I</b>	<b>Nukleofektio II</b>	<b>Nukleofektio III</b>	<b>Nukleofektio IV</b>
<b>Näytetyyppi</b>	Buffy Coat	Buffy Coat	Buffy Coat	Napaveri
<b>Yksilömäärä</b>	2	2	4	14
<b>Näytteryhmät</b>	Scramble, T2.1 ja ei NF	Scramble, T2.1 ja ei NF	Scramble, T2.1 ja ei NF	Scramble, TCF7/1 ja TCF7/3
<b>Aikapisteet</b>	0h, 24h ja 48h	24h, 48h ja 7d	0h, 24h, 48h ja 7d	0h, 24h, 48h ja 7d
<b>Th-tyypit</b>	Th1 ja Th2	Th1 ja Th2	Th1 ja Th2	Th0, Th1 ja Th2

### 3.3.7. Sytokiinituoton mittaaminen intrasellulaarisen värjäyksen avulla

Intrasellulaarinen sytokiinivärjäys tehtiin seitsemän päivää kasvatetuille soluille, koska solujen tuottamien sytokiinien perusteella voidaan sanoa ovatko solut erilaistuneen Th1- tai Th2-soluiksi. Näytteet värjättiin kahdella värillä (fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) ja fykoerytriini (PE)), joiden spektrit menevät osittain päällekkäin. Tämän korjaamiseksi käytetään kompensatiota, jossa vain yhtä väriä sisältävillä soluilla estetään värin näkyminen toisella mittauskanavalla. Kompensaatiokontrollien lisäksi tarvitaan kumpaankin väriin isotyypikontrollit, joiden avulla mitataan vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista. Näiden lisäksi mittausasetusten säätämistä varten tarvitaan värjäämättömiä soluja.

Värjättävät solut suspensoitiin ensin Ysselin kasvatusliuokseen  $1 \times 10^6$  solua/ml. Nukleofektoimattomista soluista otettiin 3 miljoonaa solua mittauksen kontrollisoluiksi. Lisäksi scramble-, siRNA- ja nukleofektoimattomista näytteistä otettiin kustakin 750 000 solua Th1-, Th2- ja Th0-soluja värjäystä varten. Kustakin näyteryhmästä aktivoitiin 250 000 solua lisäämällä 0,5 ng/ml forboli-12-myristaatti-13-asetattia (Calbiochem, Saksa) ja 500 ng/ml ionomysiiniä (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat), jotta ne saataisiin tuottamaan sytokiinejä mitattavia määriä. Lisäksi aktivoitiin kaksi miljoonaa kontrollisoluista. Näytteitä, myös aktivoimattomia, inkuboitiin 37 °C:ssa 2 tuntia, jonka jälkeen niihin lisättiin 10 mg/ml Brefeldin A:ta (Alexis, Sveitsi). Brefeldin A:n tarkoituksena on estää sytokiinien erittyminen soluista. Soluja inkuboitiin vielä 3 tuntia Brefeldin A:n lisäämisen jälkeen.

Yhteensä viiden tunnin inkubaation jälkeen solut pestiin ensin 2 kertaa 500 µl:lla värjäyspuskuria (0,5 % BSA ja 0,01 % natriumatsidia PBS:ssa) sentrifugoimalla solut pohjaan 1600 rpm 2 min ja kaatamalla supernatantti pois. Soluja pidettiin jäällä koko värjäyksen ajan. Pesujen jälkeen solut fiksattiin 100 µl:lla 4 % paraformaldehydiä (PBS:ssä, pH 7-7,2) inkuboimalla putkia 15 min. Tämän jälkeen solut pestiin värjäyspuskurilla kuten edellä. Solut permeabilisoitiin inkuboimalla niitä 10 min 100 µl:ssa permeabilisaatiopuskuria (0,5 % saponiini, 0,5 % BSA ja 0,01 % natriumatsidi PBS:ssa). Tämän jälkeen lisättiin vasta-aineet, IFN $\gamma$ -FITC (hiiren IgG1, Invitrogen, Yhdysvallat) ja IL4-PE (rotan IgG1, Invitrogen, Yhdysvallat), sekä aktivoituihin soluihin että 250 000 aktivoimattomia soluja ja putkia inkuboitiin 20 min. Toiseen kompensatiönäytteeseen lisättiin pelkästään IFN $\gamma$ -



FITC:iä ja toiseen pelkästään IL4-PE:tä. Lisäksi toiseen isotyypikontrolliin lisättiin hiiren IgG1-FITC (Invitrogen, Yhdysvallat) ja toiseen isotyypikontrolliin rotan IgG1-PE (Invitrogen, Yhdysvallat). Solut mitattiin FACSCalibur virtausytometrillä (BD Biosciences, Yhdysvallat) ja analysoitiin CellQuest-ohjelmistolla (BD Biosciences, Yhdysvallat).

### 3.3.8. Geenien ilmenemisen mittaaminen reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä

Nukleofektiokasvatuksen aikana kerätyistä näytteistä eristettiin RNA samalla tavalla kuin kohdassa 3.1.1. on kerrottu. Eristykseen jälkeen näytteiden RNA-pitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) ja laatu tarkistettiin kapillaarielektroforeesilla (Experion, Bio-Rad, Yhdysvallat). cDNA tehtiin 50 ng:sta totaali-RNA:ta valmistajan ohjeen mukaan käyttäen alukkeena oligo dT:tä (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Applied Science, Saksa).

RT-qPCR -ajot tehtiin ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems -laitteella (Applied Biosystems, Yhdysvallat). Näytteitä inkuboitiin ensin 15 min 95 °C:ssa, jonka jälkeen toistettiin 40 kierrosta 15 s 95 °C:ssa ja 1 min 60 °C:ssa. Reaktiivilavuutena PCR:ssä käytettiin 10 µl:aa:

- 5 µl 2x ABsolute QPCR ROX mix (ABgene, Iso-Britannia)
- 1 µl 5' aluke, 3 µM
- 1 µl 3' aluke, 3 µM
- 1 µl koetin, 2 µM
- 2 µl 1:10 laimennettu cDNA

Näytteistä mitattiin tietyt merkkigeenit, joiden tiedetään ilmenevän eri lailla Th1- ja Th2-soluissa. Alukkeet ja koettimet on suunniteltu Primer Express -ohjelmistolla (Applied Biosystems, Yhdysvallat), paitsi LEF1:n suunniteltiin ProbeFinder -ohjelmalla (Roche Applied Science, Saksa). Alukkeiden ja koettimien sekvenssit ovat taulukossa 2.

**Taulukko 2. RT-qPCR:ssä käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvenssit.** Koettimet, LEF1:n koetinta lukuun ottamatta, on leimattu kahdella fluoresoivalla leimalla, 5' päässä FAM ja 3' päässä TAMRA. Myös LEF1:n koettimessa 5' päässä on FAM, mutta 3' pään leima ei fluoresoi.

**EF1 $\alpha$** 

5' aluke: 5'-CTGAACCATCCAGGCCAAAT-3'  
 3' aluke: 5'-GCCGTGTGGCAATCCAAT-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-AGCGCCGGCTATGCCCTG-(TAMRA)-3'

**GATA3**

5' aluke: 5'-GGACGCGGCGCAGTAC-3'  
 3' aluke: 5'-TGCCTTGACCGTTCGATGTTA-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-TGCCGGAGGAGGTGGATGTGCT-(TAMRA)-3'

**IFN $\gamma$** 

5' aluke: 5'-CTCGAAACAGCATCTGACTCCTT-3'  
 3' aluke: 5'-TGTCCAACGCAAAGCAATACA-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-TGCTGGCGACAGTTCAGCCATCAC-(TAMRA)-3'

**IL12Rec $\beta$ 2**

5' aluke: 5'-CGTTTGTGGCACCAAGCA-3'  
 3' aluke: 5'-GCTGGAAGTAATGCGTTGAGAA-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-TGCATTGCTATCATCATGGTGGGCAT-(TAMRA)-3'

**LEF1**

5' aluke: 5'-CAGGCTGGTCTGCAAGAGA-3'  
 3' aluke: 5'-CCTGATGCAGATTCTGTAGTTT-3'  
 koetin: Universal ProbeLibrary probe #35 (Roche, Saksa)

**NFIL3**

5' aluke: 5'-AGCTCGCTGTCCGATGTTTC-3'  
 3' aluke: 5'-CTTCTGCAGCTTCCCTGCAC-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-TCCTCAGTAGAACACACGCAGGAGAGCTC-(TAMRA)-3'

**SATB1**

5' aluke: 5'-ACCAGTGGGTACGCGATGA-3'  
 3' aluke: 5'-TGTTAAAAGCCACACGTGCAA-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-AACGAGCAGGAATCTCCCAGGCG-(TAMRA)-3'

**T-bet**

5' aluke: 5'-ACAGCTATGAGGCTGAGTTTCGA-3'  
 3' aluke: 5'-GGCCTCGGTAGTAGGACATGGT-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-TCAGCATGAAGCCTGCATTCTTGCC-(TAMRA)-3'

**TCF7**

5' aluke: 5'-CTGCAGACCCCTGACCTCTCT-3'  
 3' aluke: 5'-ACACCAGAACCTAGCATCAAGGAT-3'  
 koetin: 5'-(FAM)-CTCCCTGACCTCAGGCAGCATGG-(TAMRA)-3'

RT-qPCR:ssä mittausarvo on ns. Ct-arvo (threshold cycle). Tutkimuksessa käytettiin suhteellista kvantitointia eli tietyn geenin ilmenemiseron kahden näytteen välillä lasketaan vertailemalla näytteen Ct-arvoja. Näytteen käsittely aiheuttaa kuitenkin teknistä vaihtelua cDNA-näytteen pitoisuuteen ja siksi jokaisesta näytteestä mitataan kontrolligeenin taso,

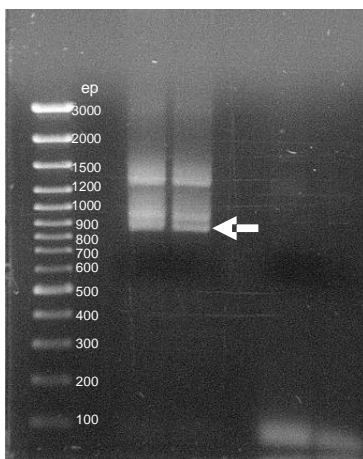
joka ilmenee suhteessa cDNA:n määrään, ja tutkittavan geenin Ct-arvoa verrataan kontrolligeenin Ct-arvoon. Käytännössä tutkittavan geenin Ct-arvosta vähennetään kontrolligeenin Ct-arvo ja saadaan normalisoitu signaali, jota kutsutaan  $\Delta\text{Ct}$ -arvoksi. Eri näytteiden  $\Delta\text{Ct}$ -arvot ovat siis vertailukelpoisia keskenään. Eroa kahden näytteen  $\Delta\text{Ct}$ -arvojen välillä merkitään  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -arvolla. Todellinen muutoksen suuruus saadaan laskemalla  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (ks. Applied Biosystems User Bulletin #2).

On tärkeää, että RT-qPCR:ssä käytetty kontrolligeeni ilmenee tasaisesti tutkittavissa soluissa aktivaatiosta tai stimulaatiosta riippumatta, koska muiden geenien mittausarvoa verrataan kontrolligeenin arvoon. Hamalainen ym. (2001) löysivät sopivan kontrolligeenin T-auttajasoluille, EF1 $\alpha$ :n, käytyään läpi monia kandidaatteja.

## 4. Tulokset

### 4.1. TCF7:n 2S- ja 2L-isoformien kloonauus

TCF7:n 2S-isoformin monistamisen jälkeen geelillä oli nähtävissä kolme eripituista PCR-tuotetta (ks. kuva 4). Muoto 2S on pituudeltaan 807 emäsparia eli voisi vastata kuvassa 13 alinta PCR-tuotetta. Kaksi muuta kuvassa esiintyvää PCR-tuotetta ei vastaa pituudeltaan yhtäkään UniprotKB-proteiinitietokannassa esitettyä TCF7-muotoa. Kyseessä saattaa kuitenkin olla jotain muotoja TCF7:stä, sillä Van de Wetering ym. (1996) ovat laskeneet, että vaihtoehtoisten promoottoriensa, eksoniensa ja pilkkoutumiskohtiensa ansiosta, TCF7-geenistä olisi teoriassa mahdollista tuottaa 96 erilaista mRNA:ta.

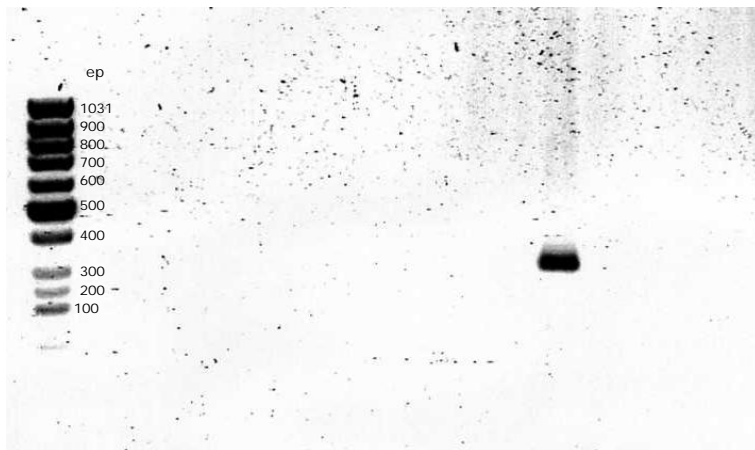


**Kuva 4. TCF7:n 2S-muodon PCR.** Kun TCF7 2S-muotoa monistettiin PCR:llä, saatiin kolme erikokoista PCR-tuotetta, joista alin voisi vastata pituudeltaan 2S-isoformia. Kuvassa ep = emäspari.

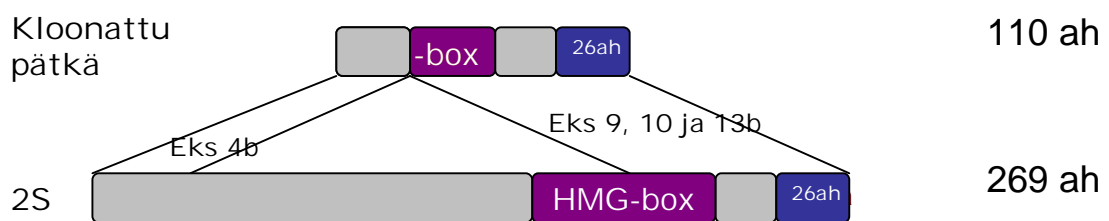
2L-isoformin monistus PCR:llä ei onnistunut, vaikka kokeilin lähtömateriaalina sekä Thp-soluja että Th1- ja Th2-soluja. Yritin myös muokata PCR-ohjelmaa laskemalla sitoutumislämpötilaa. On siis mahdollista, että kyseistä TCF7-muotoa ei ilmene käyttämässäni näytteissä tai PCR-reaktio tai primerit vaatisivat lisää optimointia.

Kun 2S-PCR:n geeliltä eristetyt PCR-tuotteet oli puhdistettu, ylimpää PCR-tuotetta oli 3,15 µg, keskimmäistä 3,61 µg ja alimmaista 1,99 µg. Kukin PCR-tuote liitettiin vektoriin ja siirrettiin bakteeriin. Bakteereista muodostui 12 pesäkettä, joista kuuteen oli siirretty 2S-

PCR -geelillä ylimmäinen PCR-tuote, viiteen keskimmäinen ja yhteen alimmainen. Kun näistä pesäkkeistä ajettiin PCR, ainoastaan yhdestä pesäkkeestä saatiin PCR-tuote (ks. kuva 5). Tämä tuote oli peräisin 2S-PCR:n keskimmäisestä PCR-tuotteesta. Pesäke-PCR:ssä ainoa muodostunut PCR-tuote oli selvästi 2S-muotoa lyhyempi, vain n. 300 emäsparia. Kun PCR-tuote oli sekvensoitu, voitiin sekvenssejä vertailemalla todeta, että kyseinen PCR-tuote sisältää muodon 2S alku- ja loppuosan (ks. kuva 6). Lähes 500 emäsparin pituinen pätkä isoformin keskeltä puuttui. On mahdollista, että kun 2S-muoto on katkaistu entsyymeillä kloonausta varten, PCR-tuote on katkennut useammasta kohdasta ja ligoitiossa on liitetty yhteen 2S-muodon alku- ja loppupäät.



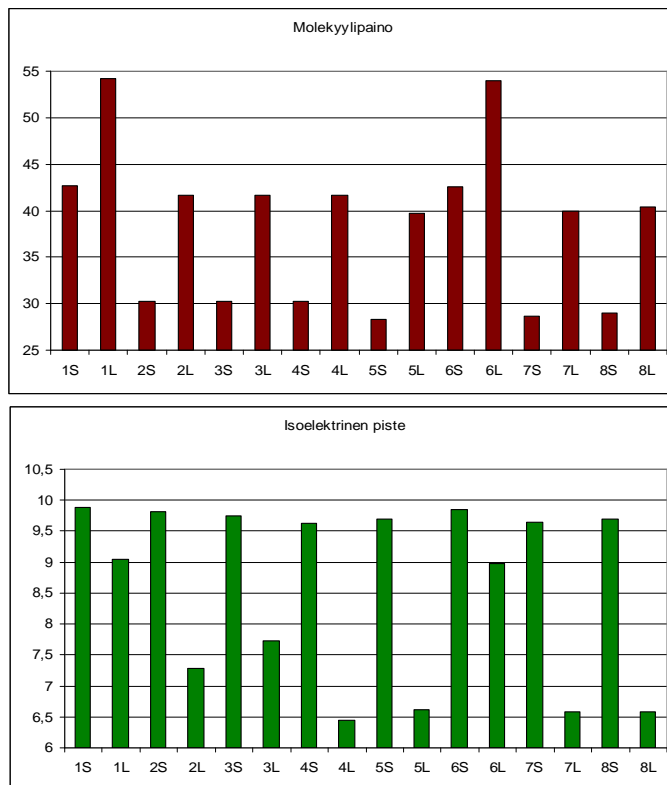
**Kuva 5. Pesäke-PCR.** Vain yhdestä pesäke-PCR -reaktiosta saatiin PCR-tuote, ja sekin vain n. 350 emäsparia (ep) pitkä.



**Kuva 6. Kloonattu pätkä.** Pesäke-PCR:ssä muodostunut PCR-tuote sisälsi ainoastaan TCF7:n 2S-muodon alku- ja loppuosan, eli eksonit 4b, 9 ja 10.

## 4.2. 2D-immunoblottaus

TCF7:llä on monta eri isoformia, eikä tiedetä mikä näiden kunkin isoformin rooli on T-soluissa. Halusimme tietää, mitkä TCF7-isoformeista ilmenevät T-auttajasoluissa ja ilmenekö Th1- ja Th2-soluissa eri isoformeja. Koska monet TCF7-muodoista ovat niin samankokoisia (ks. kuva 7), että niiden erottaminen voi olla vaikeaa yksisuuntaisella SDS-PAGE-geelillä, ajattelimme tehdä TCF7-immunoblottauksen isolle geelille ja erotella proteiinit geelillä koon lisäksi isoelektrisen pisteen avulla.



**Kuva 7. TCF7:n eri proteiini-isoformien molekyylipaino ja isoelektrinen piste.** Kuva tehty UniprotKB-proteiinitietokannan tietojen perusteella.

Immunoblottauksessa TCF7-vasta-aineella ei saatu näkymään mitään, vaikka geelin hopeavärjäyksestä näki, että proteiinit ovat siirtyneet geeliltä membraanille. Asian varmistamiseksi päätimme kokeilla mittausta toisella vasta-aineella ja valitsimme  $\beta$ -aktiinin (ks. kuva 8). Kuvasta näkee selvästi, että proteiinin siirto on toiminut.



**Kuva 8. 2D-immunoblottaus,  $\beta$ -aktiini.** Proteiinien siirto 2D-geeliltä membraanille on onnistunut ja  $\beta$ -aktiini antaa voimakkaan signaalin jo minuutin valotusajan jälkeen.

Koetimme muokata TCF7-mittausta lisäämällä vasta-aineen määrää, vähentämällä pesuja ja testaamalla immunoblottausta erilaisilla näytteillä, mutta mikään näistä ei tuottanut signaalia. Voi olla, että siirryttäessä suureen mittakaavaan TCF7-mittausohjetta pitäisi muokata paljon enemmän proteiinin havaitsemiseksi. Yksittäisten isoformien proteiinin määrä voi myös olla niin pieni, ettei niiden mittaaminen tällä menetelmällä onnistu lisäämättä käytettävää kokonaisproteiinimäärää huomattavasti.

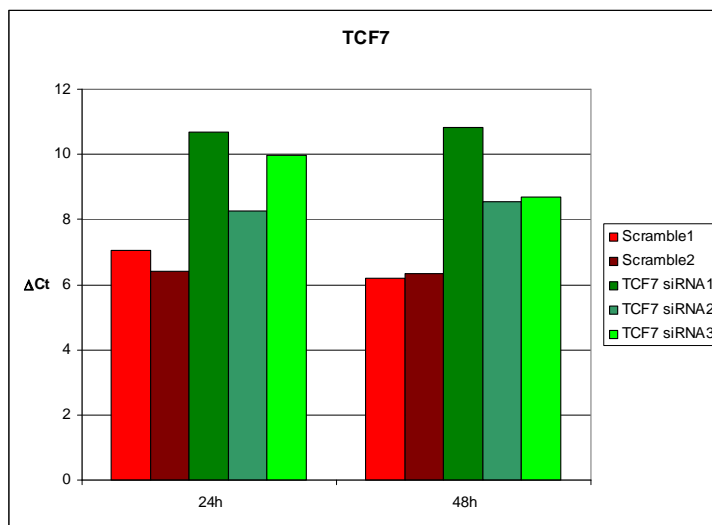
### 4.3. Nukleofektiokasvatukset

Nukleofektiokasvatuksia varten tilatut näytteet ja niistä eristettyjen solujen määrät on esitetty taulukossa 3. Nukleofektiokasvatuksista I – III taulukkoon on lisätty solumäärät myös kuolleiden solujen poiston ja H2K<sup>k</sup>-rikastuksen jälkeen. Vaikka suuri osa soluista kuoli heti nukleofektion jälkeen, olivat eloon jääneet solut yleensä suhteellisen hyväkuntoisen näköisiä ja niiden määrä saattoi jopa kasvaa viikon kasvatuksen kuluessa. Nukleofektiokasvatus II:n aikana solut voivat huonosti, erityisesti viimeisen aikapisteen aikana. Scramble-näytteissä oli vain vähän soluja jäljellä ja RNA-saannot jäivät todella pieniksi.

**Taulukko 3. Solueristysten solumäärät.** Solusaaliit nukleofektiokasvatuksen eristysvaiheissa. Scr tarkoittaa scramble-näytteitä, joissa on siRNA:n sijaan käytetty sekvenssiä joka ei aiheuta geenin hiljenemistä. T2.1 on siRNA-konstruktio, jotka hiljentävät TCF7:n ilmenemistä.

	Nukleofektio I	Nukleofektio II	Nukleofektio III	Nukleofektio IV
Näytetyyppi	Buffy Coat	Buffy Coat	Buffy Coat	Napaveri
Yksilömäärä	2	2	4	14
CD4+ määrä	292,8x10 <sup>6</sup>	326,7x10 <sup>6</sup>	729x10 <sup>6</sup>	201
Kuolleiden solujen poisto	Scr: 28,56x10 <sup>6</sup> T2.1: 33,18x10 <sup>6</sup>	Scr: 39,06x10 <sup>6</sup> T2.1: 33,32x10 <sup>6</sup>	Scr: 97,5x10 <sup>6</sup> T2.1: 131,75x10 <sup>6</sup>	Ei tehty
H2K <sup>k</sup> solujen rikastaminen	Scr: 12,4x10 <sup>6</sup> T2.1: 14x10 <sup>6</sup>	Scr: 12,8x10 <sup>6</sup> T2.1: 17,8x10 <sup>6</sup>	Scr: 48,6x10 <sup>6</sup> T2.1: 38,75x10 <sup>6</sup>	Ei tehty

Sillä aikaa, kun tein nukleofektiokasvatuksia I – III professori Lahesmaan laboratoriossa testattiin napaveren solujen nukleofektointia siRNA-oligonukleotideilla. Testaukseen otettiin mukaan myös TCF7-siRNA-oligonukleotidit. Eristin näistä TCF7-siRNA-näytteistä, RNA:t, tein cDNA:n ja mittasin sekä kontrollogeeni EF1- $\alpha$ :n että TCF7:n ilmenemisen. Scramble-näytteet käsiteltiin testauksen muiden näytteiden kanssa, joten minun tehtävänä oli mitata niistä ainoastaan TCF7:n ilmeneminen. Tulokset on esitetty kuvassa 9.



**Kuva 9. TCF7-siRNA – oligotestaus.** TCF7:n ilmeneminen hiljenee paremmin TCF7 siRNA1:llä ja TCF7 siRNA3:lla kuin TCF7 siRNA2:lla. Kuvassa punaiset pylväät edustavat kahta eri scramble-siRNA-oligonukleotideja ja vihreät eri TCF7-siRNA-oligonukleotideja.

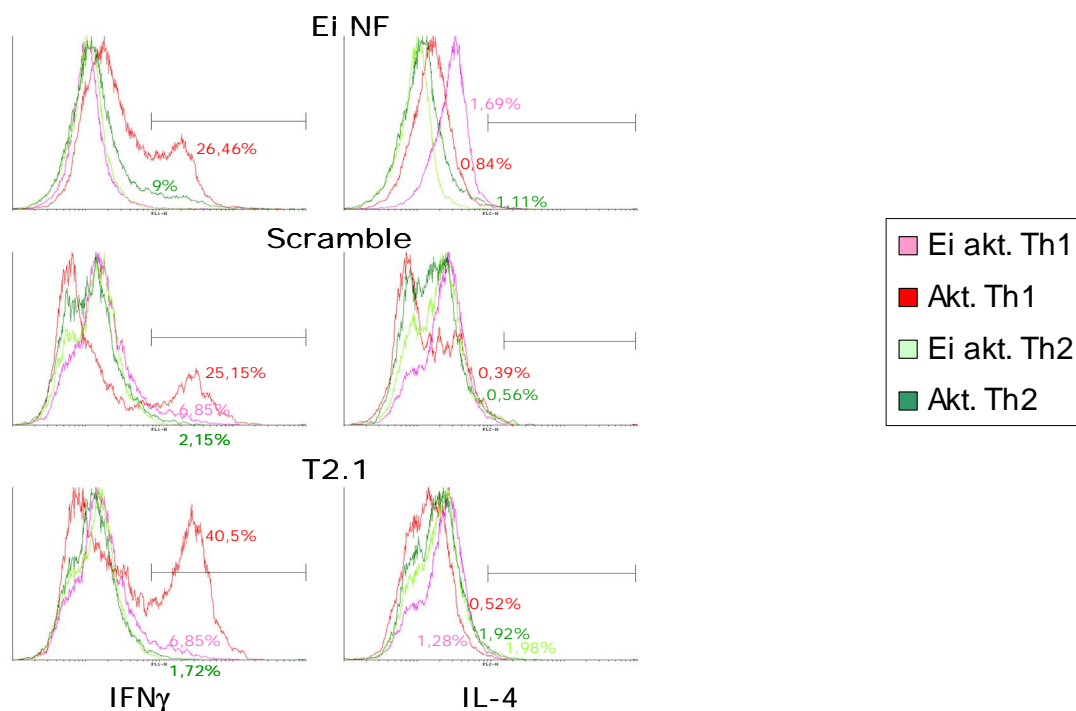
Testistä näkee, että TCF7-siRNA1 ja TCF7-siRNA3 hiljentävät TCF7:n ilmenemistä paremmin kuin TCF7-siRNA2 (näytteiden  $\Delta$ Ct-arvo on suurempi) ja siksi ne valittiin Nukleofektiokasvatus IV:ään. RT-qPCR:n tulosten tulkitsemisesta on kerrottu tarkemmin kappalessa 3.3.8.

#### 4.3.1. IFN $\gamma$ :n ja IL4:n tuotto

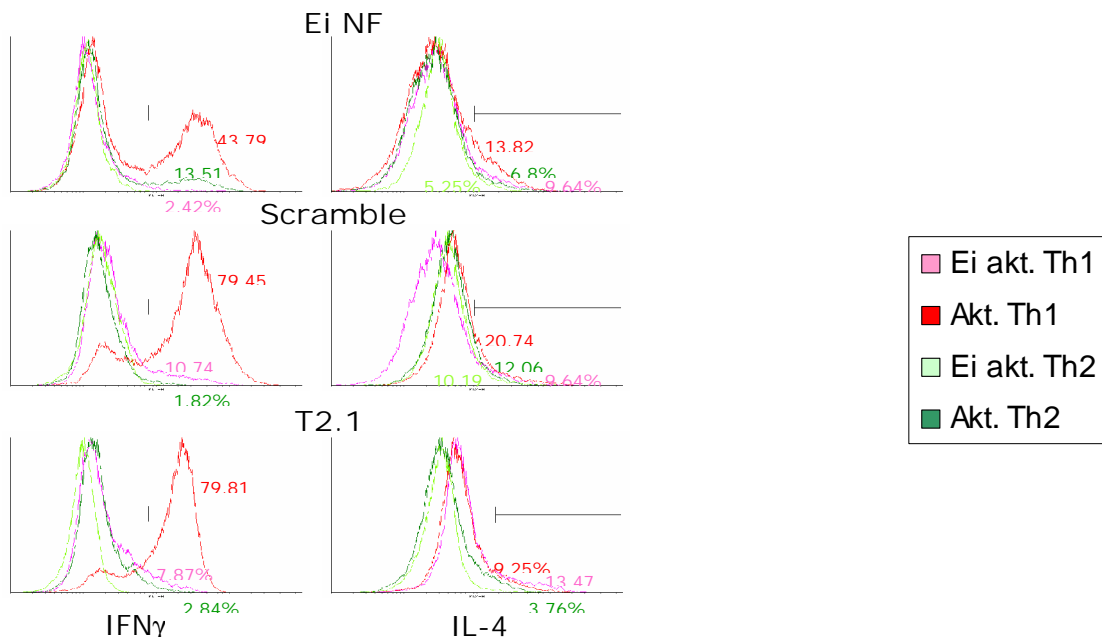
Viikon kuluttua kasvatuksen aloittamisesta nukleofektioista II, III ja IV kerättiin näytteet, intrasellulaariseen värjäykseen, jolla mitattiin solujen IFN $\gamma$ - ja IL4-tuottoa. Näiden sytokiiniin tuotto kertoo Th-solujen erilaistumissuunnan. Virtaussytometrillä mitatut sytokiinitasot eri kasvatuksista on esitetty kuvissa 10 - 12. Sytokiinin tuotto on esitetty x-akselilla, y-akselilla on mitattujen solujen määrä. Kuvissa 10 ja 11 on esitetty kunkin näyteryhmän



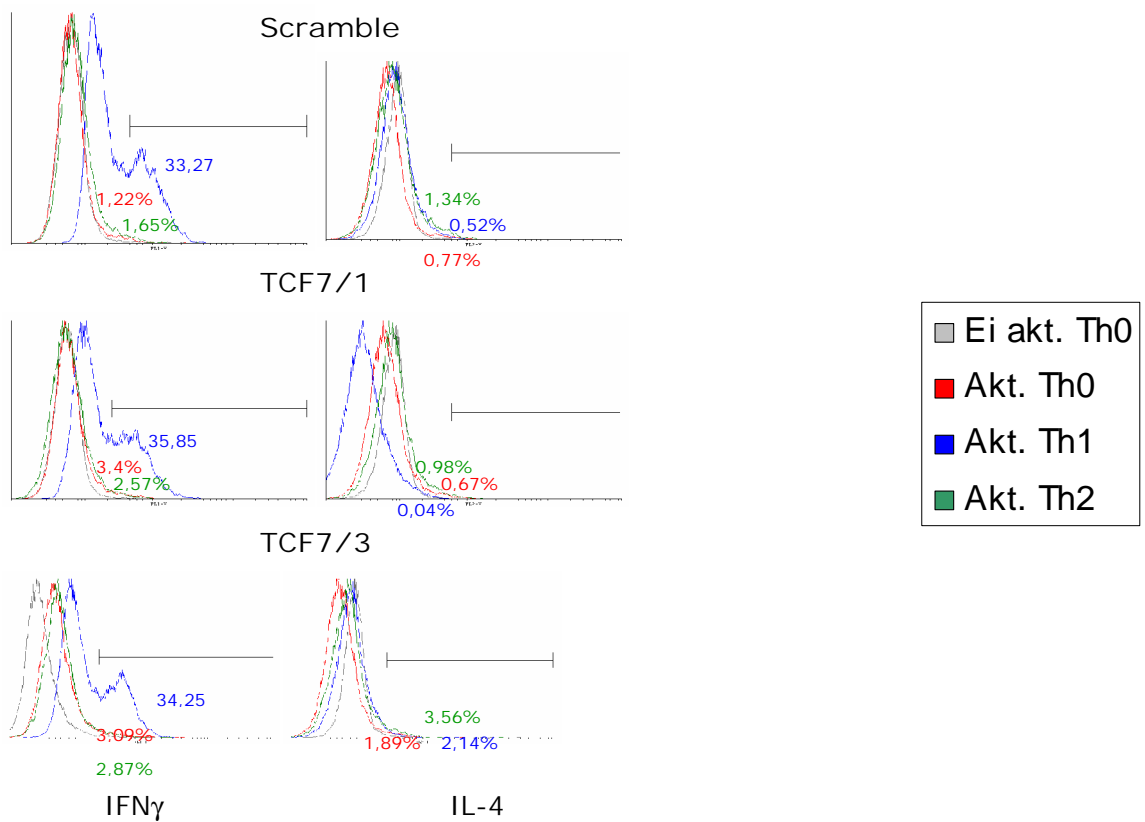
Th1- ja Th2-solut samassa kuvassa. Solujen sytokiinituotosta kertovat PMA:lla ja ionomyysiinillä aktivoidut solut, mutta aktivoimattomat solut ovat mukana kuvaamassa taustaa. Aktivoiduista soluista on annettu sytokiinituoton suhteen positiiviseksi katsottujen solujen prosenttiosuus kaikista elävistä soluista. Lisäksi kuvaan on merkitty aktivoimattomien solujen prosenttiosuus, mikäli se on yli 2 %. Kuvassa 12 aktivoimattomat Th1- Th2-solut on jätetty pois kuvan selkiyttämiseksi ja aktivoimattomia soluja edustamaan on valittu Th0-näyte.



**Kuva 10. Nukleofektio II -solujen IFN $\gamma$ - ja IL4-tuotto.** Intraselulaarisen värjäyksen tulokset. Kuvassa punaiset käyrät esittävät Th1-näytteitä ja vihreät Th2-näytteitä; vaaleat värit ovat aktivoimattomia soluja, jotka toimivat värjäyksessä negatiivisena kontrollina ja tummemmat kertovat solujen sytokiinituotosta.



**Kuva 11. Nukleofektio III -solujen IFN $\gamma$ - ja IL4-tuotto.** Intraselulaarisen värjäyksen tulokset. Kuvassa punaiset käyrät esittävät Th1-näytteitä ja vihreät Th2-näytteitä; vaaleat värit ovat aktivoimattomia soluja, jotka toimivat värjäyksessä negatiivisena kontrollina ja tummemmat kertovat solujen sytokiinituotosta.



**Kuva 12. Nukleofektio IV -solujen IFN $\gamma$ - ja IL4-tuotto.** Intraselulaarisen värjäyksen tulokset. Kuvassa punaiset käyrät esittävät Th1-näytteitä ja vihreät Th2-näytteitä; vaaleat värit ovat aktivoimattomia soluja, jotka toimivat värjäyksessä negatiivisena kontrollina ja tummemmat kertovat solujen sytokiinituotosta.

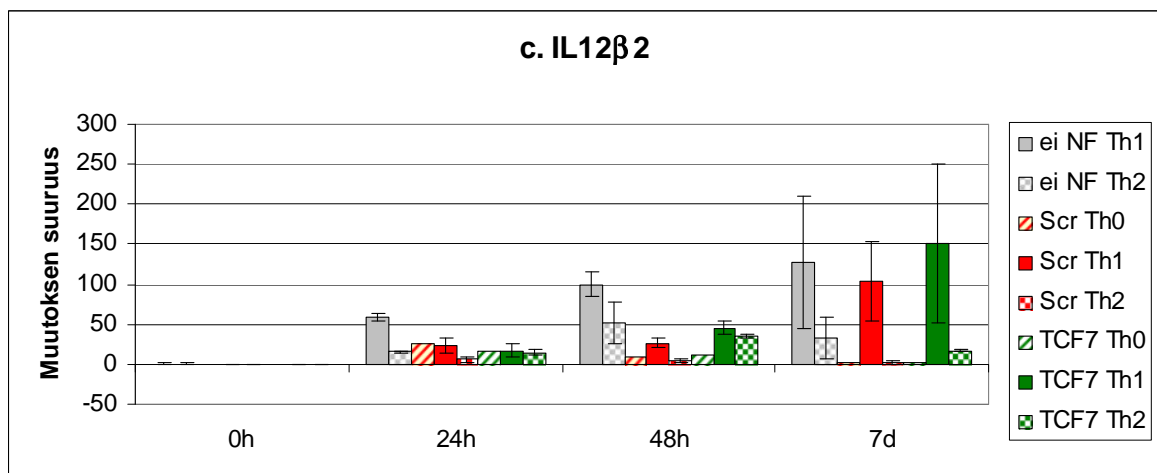
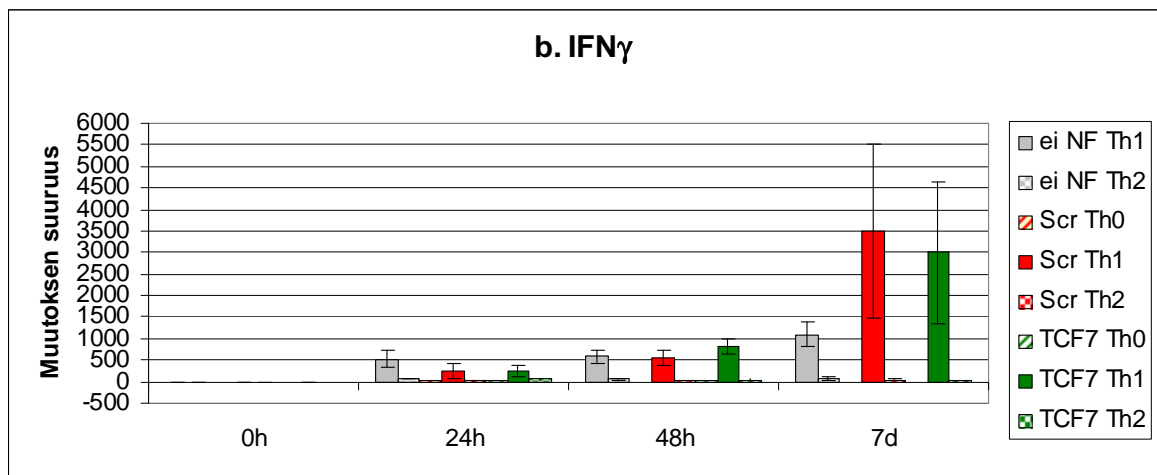
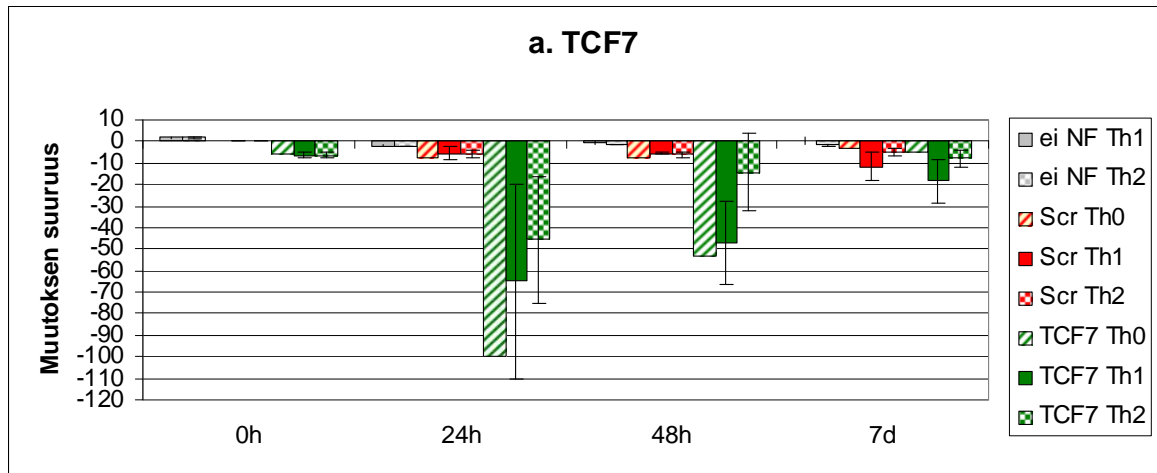
Kuvien perusteella näyttää siltä, että TCF7:n hiljentäminen saattaisi lisätä hieman solujen IFN $\gamma$  tuottoa. Suurin ero on kuitenkin nähtävissä kasvatuksessa II, jossa solut olivat huonokuntoisia, eivätkä tulokset välttämättä ole luotettavia. Solujen IL4-tuottoon ei TCF7 siRNA:lla näyttänyt olevat mitään vaikutusta. Solut tosin tuottavat normaalistikin vain vähän IL4:ää, joten pientä muutosta olisi vaikea havaitakaan.

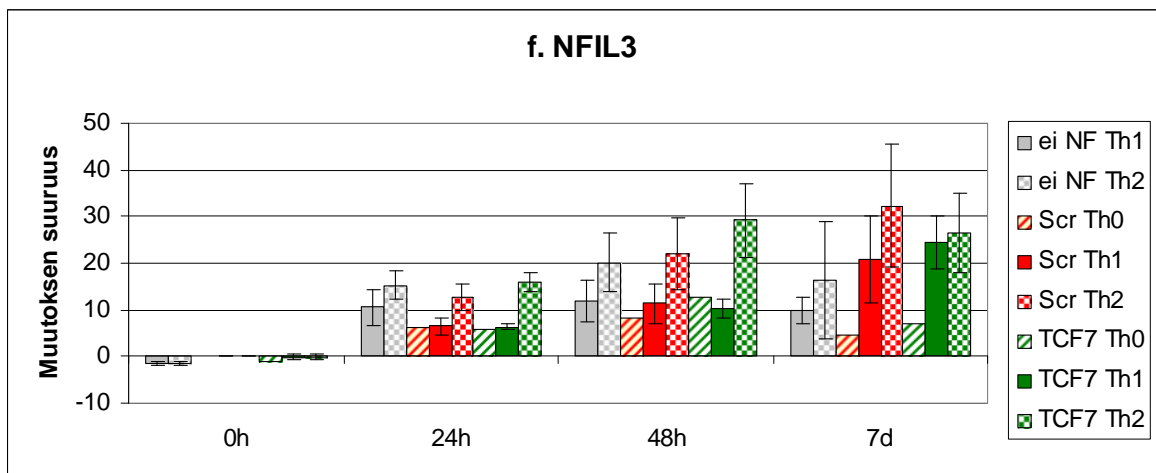
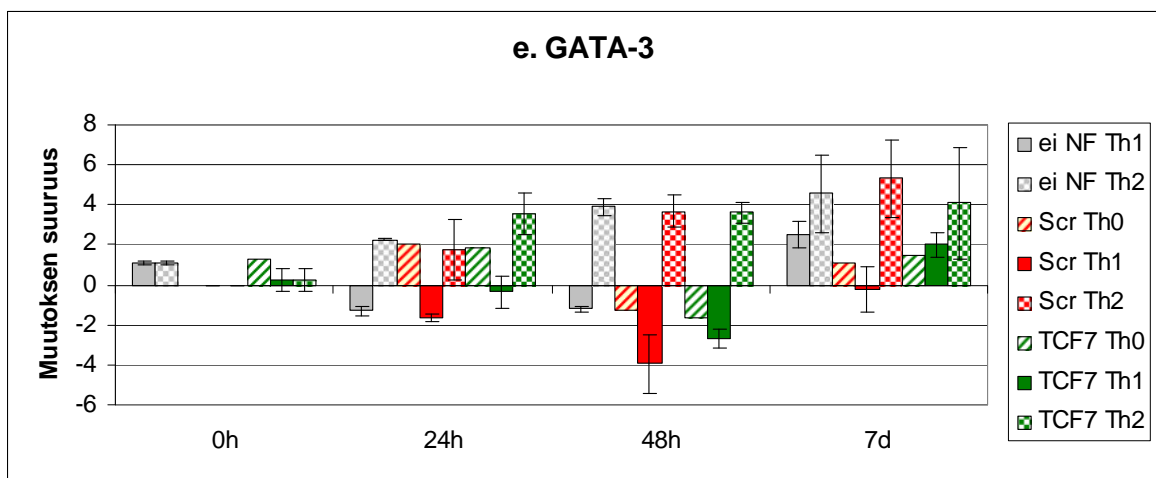
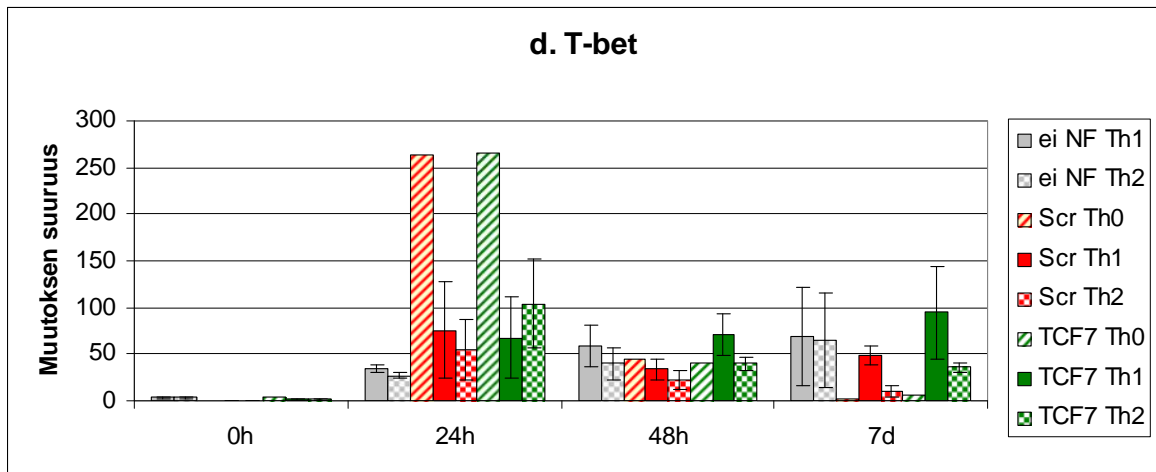
#### 4.3.2. Geenien ilmeneminen

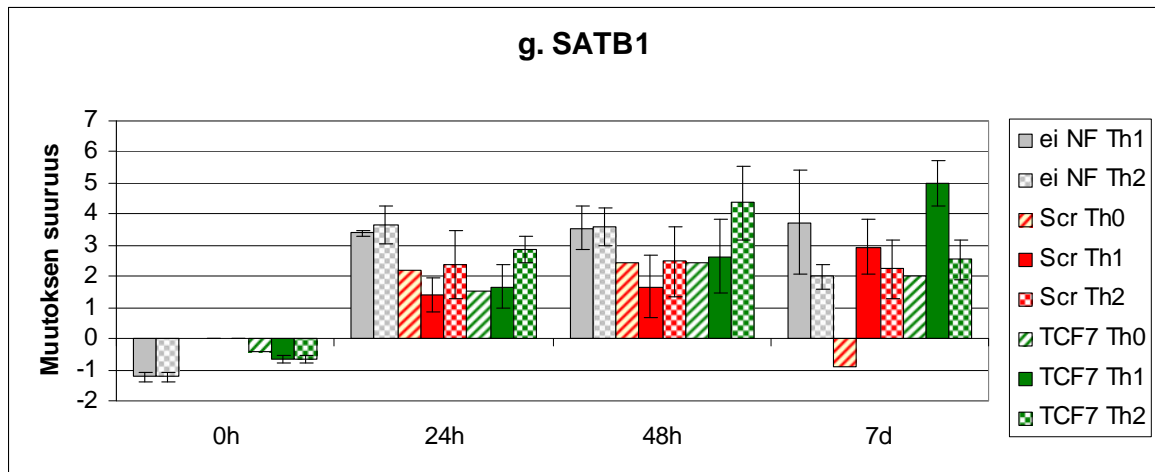
Erilaistamiskasvatuksen näytteistä mitattiin RT-qPCR:llä TCF7:n ilmenemistaso, jotta nähtäisiin, miten hyvin siRNA on hiljentänyt TCF7:n ilmenemisen (ks. kuva 7a). Lisäksi mitattiin kontrolligeenin, EF1- $\alpha$ :n, ilmenemistaso, johon kaikkien muiden geenien ilmeneisarvoja verrattiin. T-auttajasolujen erilaistumista mitattiin tietyillä merkkigeeneillä, joiden tiedetään ilmenevän eri tavalla Th1- ja Th2-soluissa (ks. 1.1.2. ja Lund ym., 2005)

Alla olevissa kuvissa (ks. kuva 13) on esitettyä yhteenveto merkkigeenien ilmenemisestä nukleofektiokasvatuksissa. Jokaiselle näytteryhmälle on laskettu kaikkien kasvatusten keskiarvo, paljonko kukin geeni ilmenee. Muutoksen suuruus on laskettu vertaamalla tutkittavan geenin normalisoitua ilmenemistasoa 0 h scramble-näytteen ilmenemistasoon, eli näytteeseen, joka on otettu kasvatuksen alkaessa. X-akselilla on esitetty aikapiste ja y-akselilla muutoksen suuruus. Jos muutoksen suuruus on kymmenen yksikköä, niin tutkittava geeni ilmenee kyseisessä näytteessä kymmenen kertaa enemmän kuin kasvatuksen alkaessa otetussa scramble-näytteessä. Saman suuruinen muutos negatiivisella asteikolla kertoo geenin ilmenevän kymmenen kertaa vähemmän kuin vertailunäytteessä. Mitatut arvot vaihtelivat melko paljon kasvatusten välillä, mikä näkyy kuvan virhepalkeista, jotka kertovat keskiarvon keskivirheestä.

**Kuva 13. Geenien ilmeneminen nukleofektiokasvatuksissa. a.** TCF7:n ilmenemisen hiljentäminen kertoo siRNA:n vaikutuksesta. **b – d.** IFN $\gamma$ , IL12R $\beta$ 2 ja T-bet ilmenevät enemmän Th1-suuntaan erilaistuvissa soluissa. **e – g.** GATA-3, NFIL3 ja SATB1 ilmenevät enemmän Th2-suuntaan erilaistuvissa soluissa. Kuvis- sa harmaat palkit esittävät nukleofektoimattomia soluja, jotka toimivat nukleofektiokasvatuksissa I, II ja III kasvatuksen kontrollisoluina. Punaiset palkit ovat scramble-näytteitä eli siRNA-kontrollinäytteitä ja vihreät palkit kuvaavat näytteitä, joissa TCF7 on hiljennetty. Th1 ovat yksivärisiä, Th2 solut ruudullisia ja Th0-solut raidallisia.

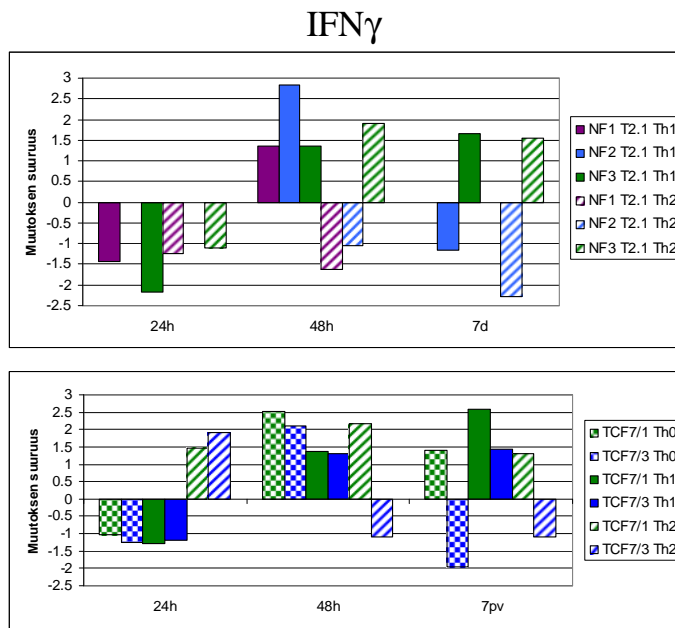




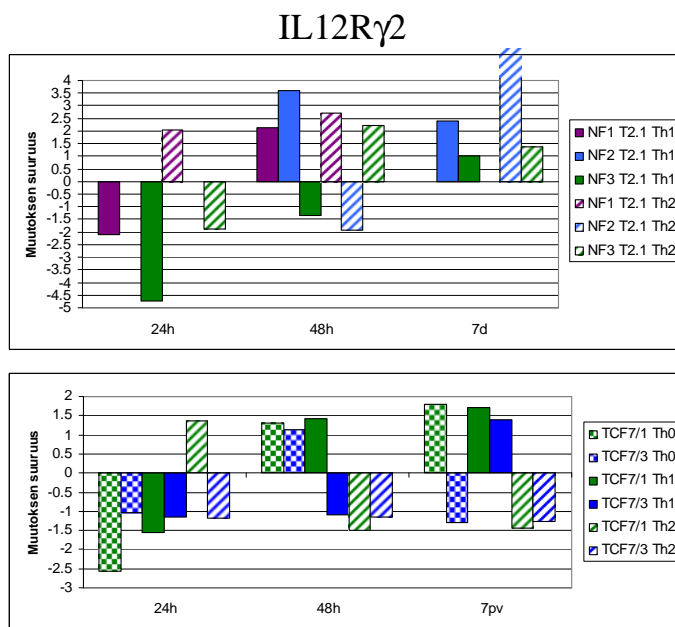


Kuvasta 13a näkee, että siRNA on hiljentänyt TCF7:n ilmenemistä. Neljännessä kasvatuksessa käytetyistä siRNA-oligonukleotideista TCF7/1 toimii selvästi paremmin kuin TCF7/3, jonka hiljentämisvaikutus on yhtä suuri kuin nukleofektiokasvatuksissa I – III käytetyllä plasmidikonstruktilla. Napaveren soluissa hiljentäminen on voimakkainta vuorokauden jälkeen kasvatuksen aloittamisesta, mutta BC-kasvatuksissa vasta kahden vuorokauden jälkeen. Solujen erilaistaminen on onnistunut, koska Th1-merkkigeenit, IFN $\gamma$ , IL12R $\beta$ 2 ja T-bet, ilmenevät enemmän Th1-soluissa ja Th2-merkkigeenit, GATA-3, NFIL3 ja SATB1, enemmän Th2-soluissa.

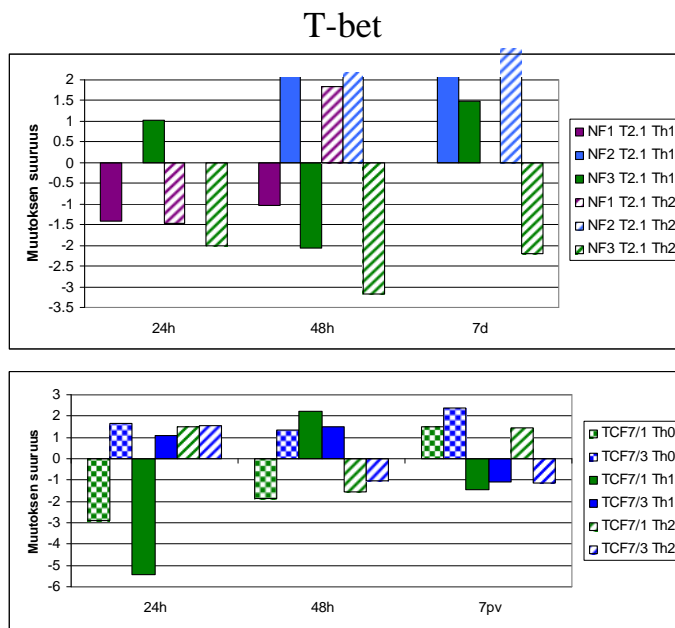
Kun verrataan kunkin aikapisteen ja näyteryhmän TCF7-siRNA-näytteitä scramble-näytteisiin, saadaan selville TCF7:n hiljentämisen vaikutus solujen erilaistumiseen. Kuvissa 14 - 16 on esitetty siRNA-näytteiden ilmenemistaso verrattuna saman aikapisteen saman polarisaation scramble-näytteeseen. Näyttäisi siltä, että TCF7:n hiljentämisen vaikutuksesta varhaisissa aikapisteissä Th1-suuntaan erilaistuvissa soluissa Th1-merkkigeenit, IFN $\gamma$ , IL12R $\beta$ 2 ja T-bet, ilmenevät hieman vähemmän kuin scramble-näytteissä, mutta kasvatuksen lopussa niiden ilmeneminen on scramble-näytteitä suurempi. Koska kasvatusta 2 oli selvästi laadultaan muita kasvatuksia huonompi, on y-akseli asteikko asetettu niin, että muiden kasvatusten tulos näkyy mahdollisimman selvästi.



**Kuva 14. IFN $\gamma$ :n ilmenemiserot.** Erilaistumiskasvatuksen alussa IFN $\gamma$  ilmenee vähemmän Th1-näytteissä, joissa TCF7 ilmeneminen on hiljennetty, mutta kasvatuksen edetessä IFN $\gamma$  ilmeneminen on jopa suurempi siRNA-näytteissä kuin kontrollinäytteissä. Ylempässä kuvassa on esitetty kasvatusten I – III näytteet ja alemmassa kasvatuksen IV näytteet. Kuvissa eri värit kuvaavat eri kasvatuksia. Ylempässä kuvassa violetit palkit kovat kasvatuksen I näytteet, siniset kasvatuksen II näytteet ja vihreät kasvatuksen III näytteet. Alemmassa kuvassa vihreät palkit kuvaavat TCF7-siRNA-oligonukleotidi 1:tä ja siniset TCF7-siRNA-oligonukleotidi 3:a. Ruudulliset palkit ovat Th0-, yksiväriset Th1- ja raidalliset Th2-näytteitä.



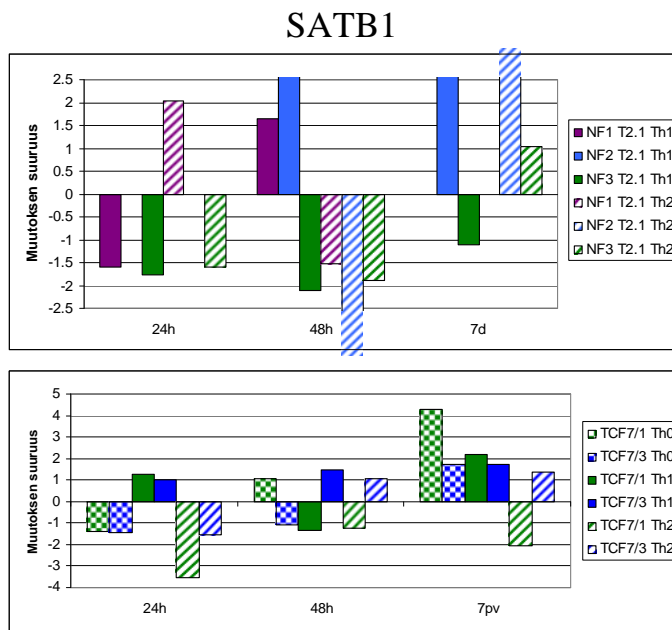
**Kuva 15. IL12R $\beta$ 2:n ilmenemiserot.** Erilaistumiskasvatuksen alussa IL12R $\beta$ 2 ilmenee vähemmän Th1-näytteissä, joissa TCF7 ilmeneminen on hiljennetty. Ylempässä kuvassa on esitetty kasvatusten I – III näytteet ja alemmassa kasvatuksen IV näytteet. Kuvissa eri värit kuvaavat eri kasvatuksia. Ylempässä kuvassa violetit palkit kovat kasvatuksen I näytteet, siniset kasvatuksen II näytteet ja vihreät kasvatuksen III näytteet. Alemmassa kuvassa vihreät palkit kuvaavat TCF7-siRNA-oligonukleotidi 1:tä ja siniset TCF7-siRNA-oligonukleotidi 3:a. Ruudulliset palkit ovat Th0-, yksiväriset Th1- ja raidalliset Th2-näytteitä.



**Kuva 16. T-betin ilmenemiserot.** Erialaistumiskasvatuksen alussa T-bet ilmenee vähemmän Th1-näytteissä, joissa TCF7 ilmeneminen on hiljennetty. Ylempässä kuvassa on esitetty kasvatusten I – III näytteet ja alemmassa kasvatuksen IV näytteet. Kuvissa eri värit kuvaavat eri kasvatuksia. Ylempässä kuvassa violetit palkit kovat kasvatuksen I näytteet, siniset kasvatuksen II näytteet ja vihreät kasvatuksen III näytteet. Alemmassa kuvassa vihreät palkit kuvaavat TCF7-siRNA-oligonukleotidi 1:tä ja siniset TCF7-siRNA-oligonukleotidi 3:a. Ruudulliset palkit ovat Th0-, yksiväriset Th1- ja raidalliset Th2-näytteitä.

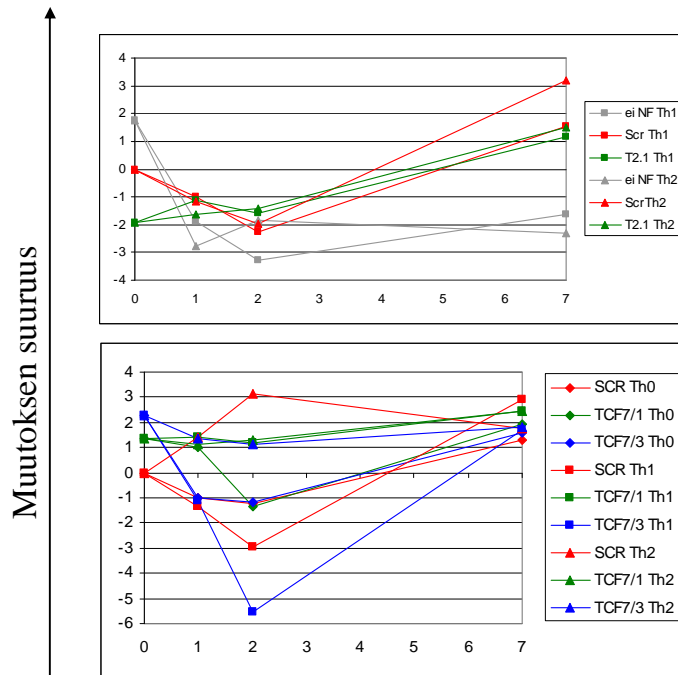
Th2-soluissa TCF7-siRNA:lla ei näytä olevan samanlaista yhtenäistä vaikutusta geenien ilmenemiseen. Ainoastaan SATB1 ilmenee hieman vähemmän Th2-soluissa, kun TCF7:n ilmeneminen on hiljennetty (ks. kuva 17).





**Kuva 17. SATB1:n ilmenemiserot.** Erilaistumiskasvatuksen alussa SATB1 ilmenee vähemmän Th2-näytteissä, joissa TCF7 ilmeneminen on hiljennetty. Ylempässä kuvassa on esitetty kasvatusten I – III näytteet ja alemmassa kasvatuksen IV näytteet. Kuvissa eri värit kuvaavat eri kasvatuksia. Ylempässä kuvassa violetit palkit kovat kasvatuksen I näytteet, siniset kasvatuksen II näytteet ja vihreät kasvatuksen III näytteet. Alemmassa kuvassa vihreät palkit kuvaavat TCF7-siRNA-oligonukleotidi 1:tä ja siniset TCF7-siRNA-oligonukleotidi 3:a. Ruudulliset palkit ovat Th0-, yksiväriset Th1- ja raidalliset Th2-näytteitä.

Koska kypsyvissä T-soluissa TCF7:llä ja LEF1:llä on osittain päällekkäiset tehtävät ja myös LEF1:n tiedetään ilmenevän kypsissä T-soluissa, päätimme mitata vaikuttaako TCF7:n hiljentäminen LEF1:n ilmenemiseen. Kasvatuksessa III scramble-näytteissä ja näytteissä, joita ei nukleofektoitu, LEF1:n ilmeneminen vähenee hieman kahden ensimmäisen vuorokauden aikana näytteissä, mutta näytteissä, joissa TCF7 on hiljennetty, sen ilmeneminen pysyy lähes samana (ks. kuva 18). Kasvatuksessa IV sen sijaan, Scramble-näytteen Th2-soluissa LEF1:n ilmeneminen lisääntyy kahden ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta vähenee Th1-soluissa. Myös siRNA-TCF7/3-näytteen Th1-solut ilmentävät vähemmän LEF1:tä kahden vuorokauden kuluttua, mutta ilmeneminen Th0- ja Th2-soluissa ei juuri eroa alkutilanteesta. Näyttäisi siltä, että näytteissä joissa TCF7:ää ei ole hiljennetty, Th1-solut ilmentäisivät vähemmän LEF1:tä kuin Th2- tai Th0-solut 48 tunnin jälkeen kasvatuksen aloittamisesta. Kun TCF7 hiljennetään, LEF1 ilmenee tasaisena solujen erilaistumisesta riippumatta ainakin kaksi vuorokautta kasvatuksen aloittamisesta.



**Kuva 18. LEF-1:n ilmeneminen.** Ylemmässä kuvassa on esitetty LEF-1:n ilmeneminen nukleofektiokasvatus III:ssä ja alemmassa nukleofektiokasvatus IV:ssä. Havaittuja mittausrvoja on verrattu kasvatuksen alkukhetken scramble-näytteeseen. Kuvissa punaiset käyrät ovat scramble-näytteitä, vihreät ja siniset siRNA-näytteitä ja harmaat käyrät ovat näytteitä, joita ei ole nukleofektoitu.

## 5. Tulosten tarkastelu

### 5.1. TCF7:n 2S- ja 2L-muotojen kloonaukset

TCF7:n muodot 2S ja 2L haluttiin kloonata, jotta niitä voitaisiin käyttää yli-ilmenemiskasvatuksissa. Niiden avulla oltaisiin nähty, onko lyhyellä ja pitkällä TCF7-isoformilla erilainen merkitys T-auttajasolujen erilaistumiseen. Kloonauksessa on useita vaiheita, joissa voi tulla ongelmia. 2L-muodon kloonaukset eivät päässeet alkua pidemmälle, koska sitä ei saatu monistettua reaktio-olosuhteiden optimoinnista huolimatta. On mahdollista, että kyseistä muotoa ei esiinny Thp- tai erilaistumassa olevissa Th1- tai Th2-soluissa, joita käytettiin lähtömateriaalina.

Lyhyemmän muodon kloonaukset näyttivät onnistuvan paremmin. Vasta monistettaessa pesäkkeitä huomattiin, että kloonattu sekvenssi oli haluttua lyhyempi. Geenipala sisälsi 2S-muodon alun ja lopun, mutta 477 emäsparia puuttuu sekvenssin keskeltä. Vaikka TCF7-geenistä on periaatteessa mahdollista tuottaa lukuisia eri isoformeja, näin lyhyellä TCF7-muodolla tuskin on mitään funktiota. Kloonatussa muodossa ei ole edes kokonaan DNA:ta sitovaa HMG-boxia (Van de Wetering ym., 1992). Mikäli tämä lyhyt muotokin osoittautuisi oikeasti esiintyväksi TCF7-isoformiksi, voisi myös muista muodoista olla näitä erittäin lyhyitä VS-muotoja (very short). Todennäköisempää on, että koska PCR:n jälkeen monistettu fragmentti oli oikean pituinen, eksonit 5 – 8 ovat irronneet digestiossa. Uusintayritys 2S-muodon kloonamisessa voisi hyvinkin tuottaa halutun lopputuloksen, kunhan 2S-muodon sekvenssi tarkastetaan restriktioentsyymien katkaisukohtien suhteen ja kloonauksen suunnitellaan uudestaan sen mukaisesti. Mikäli 2D-immunoblottaus olisi toiminut, olisi saatu jonkinlaista käsitystä mitä isoformeja T-auttajasoluissa esiintyy solujen erilaistuessa Th1- ja Th2-soluiksi. Valitettavasti TCF7-detektiota ei saatu toimimaan, vaikka olosuhteita koetettiin muokata ja itse proteiinien siirto näytti toimivan hyvin. 2D-immunoblottausta olisi hyvä testata vielä huomattavasti suuremmalla proteiinimäärällä. 2D-immunoblottausta olisi ehkä saatu vastaus myös kloonaukseen; onko soluissa isoformeja, jotka vastaavat ominaisuuksiltaan 2L- ja 2VS-muotoja.

## 5.2. Nukleofektiokasvatukset

Nukleofektiokasvatusten tarkoituksena oli tutkia miten TCF7:n hiljentäminen vaikuttaa T-auttajasolujen erilaistumiseen Th1- ja Th2-soluiksi. Viikon kuluttua kasvatuksen aloittamisesta mitattiin solujen IFN $\gamma$ - ja IL4-tuottoa ja näyttää siltä, että kun TCF7 on hiljennetty, Th1-solut tuottavat hieman enemmän IFN $\gamma$ :a. Muutos on kuitenkin niin pieni kasvatuksissa, joissa solut olivat hyväkuntoisia, että tarvittaisiin useampia toistoja tuloksen varmistamiseksi. Toisaalta yhdessäkään kasvatuksessa IFN $\gamma$ :a ei tuotettu vähemmän. Samankaltainen muutos on nähtävissä RNA-tasolla seitsemän päivän aikapisteessä. Niissä kasvatuksissa, joissa solut olivat hyväkuntoisia ja RNA-saanto kohtuullinen, IFN $\gamma$  ilmenee hieman enemmän soluissa, joissa TCF7 on hiljennetty. Kasvatuksen alussa tilanne on päinvastoin. Vuorokauden kuluttua kasvatuksen aloittamisesta IFN $\gamma$  ilmenee vähemmän soluissa, joissa TCF7 on hiljennetty.

Myös IL12R $\beta$ 2 ja T-bet, jotka tyypillisesti ilmenevät enemmän Th1-soluissa, ilmenevät vähemmän TCF7-hiljennetyissä soluissa kasvatuksen alkupuolella ja enemmän kasvatuksen edetessä. Vaikka kasvatusten välillä geenien ilmestymistasossa on vaihtelua ja ero saattaa näkyä jo vuorokauden tai vasta kahden vuorokauden jälkeen kasvatuksen alettua, kaikissa kasvatuksissa kaikilla Th1-geeneillä samankaltainen profiili. Tulos ei ollut yllättävä, sillä TCF7:n on jo aiemmin raportoitu vaikuttavan Th1-geenien, kuten IL12R $\beta$ 2:n ilmenemiseen (Noble ym., 2003).

Th2-soluissa tyypillisesti ilmenevissä geneeissä, lukuunottamatta SATB1:tä, ei ole havaittavissa yhtenäistä muutosta kuten Th1-geeneissä. Varhaisissa aikapisteissä Th2-solut ilmentävät vähemmän SATB1:tä, kun TCF7 on hiljennetty. SATB1:llä tiedetään olevan samankaltaisia ominaisuuksia kuin TCF7:llä. Nämä proteiinit voivat toimia joko transkription aktivoijana tai estäjänä. SATB1 säätelee mm. Th2-sytokiinien ilmenemistä muuttamalla kromatiinin rakennetta geenejä koodaavilla alueilla (Cai ym., 2006) ja voi toimia joko transkription aktivoijana tai estäjänä (Kumar ym., 2006). Saattaa olla, että kun TCF7:n ilmeneminen soluissa on hiljennetty, solut ilmentävät vähemmän tekijöitä, jotka

estävät Th2-geenien ilmenemistä ja SATB1:n ilmenemistä ei aktivoida kuten TCF7:n läsnäollessa.

Näytteistä mitattiin myös LEF-1:n ilmenemistä, koska haluttiin nähdä onko LEF1:llä ja TCF7:llä päällekkäiset roolit kypsissä T-auttajasoluissa kuten kehittyvissä T-soluissa (Okamura ym., 1998; Staal ja Clevers, 2000). Sekä LEF1:n että TCF7:n on todettu ilmenevän kypsissä naiiveissa T-soluissa, mutta niiden ilmenemisen vähenevän solun aktivoituesssa (Hebenstreit ym., 2008). Myös näissä kasvatuksissa LEF1:n ilmeneminen vähenee solujen aktivoituessa, paitsi kun TCF7:n ilmeneminen hiljenee. Tällöin LEF1:n ilmeneminen ei juuri muutu kasvatuksen alusta. On siis mahdollista, että TCF7:n puuttuessa, LEF1 ilmenee normaalia enemmän Th1-soluissa korvatakseen TCF7:n puutteen.

Normaalien T-solujen lisäksi TCF7 ja LEF1 ilmenevät pahanlaatuisissa soluissa esimerkiksi T-solulymfooman yhteydessä (Castrop ym., 1995). Tutkiessaan perifeerisiä T-solulymfoomia Dorfman ym. (2003) huomasivat 87 % tapauksista solujen ilmentävän Th1-merkkigeenejä. TCF7:n on siis havaittu liittyvän Th1-soluihin. Myös tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että TCF7 vaikuttaa nimenomaan Th1-solujen erilaistumiseen. TCF7:n hiljentäminen näyttäisi viivästyttävän solujen erilaistumista Th1-soluiksi. Koska viikon kuluttua kasvatuksen aloittamisesta TCF7 ei enää ole hiljennetty, Th1-solut ilmentävät tyypillisiä Th1-geenejä ja tuottavat IFN $\gamma$ :aa jopa enemmän kuin kontrollisolut.

Tulosten varmistamiseksi olisi vielä syytä tehdä lisää kasvatuksia ja mittauksia. Tehtyjä kasvatuksia oli melko vaikea verrata keskenään, koska ne poikkesivat toisistaan joko näyttemateriaalin, siRNA-konstruktin, mittauspisteiden tai solujen kunnon suhteen. Parasta olisi toistaa kasvatukset samalla tavalla, käyttäen samasta verityypistä eristettyjä soluja ja samanlaisia siRNA-konstrukteja. TCF7:n hiljentämisestä aiheutuneet muutokset olivat verrattain pieniä, joten on vaikea arvioida johtuivatko havaitut erot vain normaalista kasvatuksen välisestä vaihtelusta. TCF7:n hiljeneminen oli kuitenkin niin merkittävä, että selvempiä muutoksia olisi varmasti ollut nähtävissä, mikäli TCF7 olisi hyvin olennainen Th1- ja Th2-solujen erilaistumiselle. Olisi myös tärkeää tietää miten tutkittujen geenien ilmeneminen muuttuu, jos TCF7:ää yli-ilmennetään.

## Lähdeluettelo

- Abbas, A.K., K.M. Murphy, ja A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793.
- Afkarian, M., J.R. Sedy, J. Yang, N.G. Jacobson, N. Cereb, S.Y. Yang, T.L. Murphy, ja K.M. Murphy. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol*. 3:549-557.
- Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. 2005. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett*. 579(26):5974-81.
- Anderson, M.K. 2006. At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol Rev*. 209:191-211.
- Ariga, H., Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, T. Tamura, ja K. Takatsu. 2007. Instruction of naïve CD4<sup>+</sup> T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology*. 122:210-221.
- Atcha, F.A., A. Syed, B. Wu, N.P. Hoverter, N.N. Yokoyama, J.H. Ting, J.E. Munguia, H.J. Mangalam, J.L. Marsh, ja M.L. Waterman. 2007. A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol*. 27:8352-8363.
- Bacon CM, Petricoin EF 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Larner AC, Johnston JA, O'Shea JJ. 1995. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(16):7307-11.
- Bienz, M. 1998. TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr Opin Cell. Biol*. 10:366-372.
- Blom B, Spits H. 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 24:287-320.
- Brannon, M., M. Gomperts, L. Sumoy, R.T. Moon, ja D. Kimelman. 1997. A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev*. 11:2359-2370.
- Cai S, Lee CC, Kohwi-Shigematsu T. 2006. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat Genet*. 38(11):1278-88.
- Castrop, J., D. van Wichen, M. Koomans-Bitter, M. van de Wetering, R. de Weger, J. van Dongen, ja H. Clevers. 1995. The human TCF-1 gene encodes a nuclear DNA-binding protein uniquely expressed in normal and neoplastic T-lineage lymphocytes. *Blood*. 86:3050-3059.
- Cavallo, R.A., R.T. Cox, M.M. Moline, J. Roose, G.A. Polevoy, H. Clevers, M. Peifer, ja A. Bejsovec. 1998. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*. 395:604-608.
- Dorfman, D.M., H.A. Greisman, ja A. Shahsafaei. 2003. Loss of expression of the WNT/beta-catenin-signaling pathway transcription factors lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) and T cell factor-1 (TCF-1) in a subset of peripheral T cell lymphomas. *Am J Pathol*. 162:1539-1544.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, ja T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 15:188-200.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, ja T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411:494-498.
- Farnham PJ. 2009. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet*. 10(9):605-16.
- Fire A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*. 15(9):358-63.

- Firestein, G.S., W.D. Roeder, J.A. Laxer, K.S. Townsend, C.T. Weaver, J.T. Hom, J. Linton, B.E. Torbett, and A.L. Glasebrook. 1989. A new murine CD4<sup>+</sup> T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol.* 143:518-525.
- Gajewski, T.F., E. Goldwasser, and F.W. Fitch. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 141:2635-2642.
- Gastrop, J., R. Hoevenagel, J.R. Young, ja H.C. Clevers. 1992. A common ancestor of the mammalian transcription factors TCF-1 and TCF-1 alpha/LEF-1 expressed in chicken T cells. *Eur. J Immunol.* 22:1327-1330.
- Glimcher, L.H., ja K.M. Murphy. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* 14: 1693-1711.
- Gordon, M.D., ja R. Nusse. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281:22429-22433.
- Goux, D, J.D. Coudert, D. Maurice, L. Scarpellino, G. Jeannot, S. Piccolo, K. Weston, J. Huelsken, ja W. Held. 2005. Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood.* 106:1726-1733.
- Hattori, N., H. Kawamoto, S. Fujimoto, K. Kuno, ja Y. Katsura. 1996. Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. *J Exp Med.* 184:1137-1147.
- Hebenstreit D, Giaisi M, Treiber MK, Zhang XB, Mi HF, Horejs-Hoeck J, Andersen KG, Krammer PH, Duschl A, Li-Weber M. 2008. LEF-1 negatively controls interleukin-4 expression through a proximal promoter regulatory element. *J Biol Chem.* 283(33):22490-7.
- Hovanes, K., T.W. Li, J.E. Munguia, T. Truong, T. Milovanovic, J. Lawrence Marsh, R.F. Holcombe, ja M.L. Waterman. 2001. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet.* 28:53-57.
- Hamalainen, H.K., J.C. Tubman, S. Vikman, T. Kyrölä, E. Ylikoski, J.A. Warrington, ja R. Lahesmaa. 2001. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal Biochem.* 299:63-70.
- Ikuta, K., N. Uchida, J. Friedman, ja I.L. Weissman. 1992. Lymphocyte development from stem cells. *Annu Rev Immunol.* 10:759-783.
- Ioannidis, V., F. Beermann, H. Clevers, ja W. Held. 2001. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol.* 2:691-697.
- Ivascu, C., R. Wasserkort, R. Lesche, J. Dong, H. Stein, A. Thiel, ja F. Eckhardt. 2007. DNA methylation profiling of transcription factor genes in normal lymphocyte development and lymphomas. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1523-1538.
- Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, Tammana H, Gingeras TR. 2004. Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res.* 14(3):331-42.
- Kaplan, M.H., U. Schindler, S.T. Smiley, ja M.J. Grusby. 1996. Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. *Immunity.* 4:313-319.
- Katoh M, Katoh M. 2007. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 13(14):4042-5.

- Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H, Ishii S, Sugiyama T, Saito K, Isono Y, Irie R, Kushida N, Yoneyama T, Otsuka R, Kanda K, Yokoi T, Kondo H, Wagatsuma M, Murakawa K, Ishida S, Ishibashi T, Takahashi-Fujii A, Tanase T, Nagai K, Kikuchi H, Nakai K, Isogai T, Sugano S. 2006. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 16(1):55-65.
- Lai AY, Kondo M. 2008. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol.* 20(4):207-12.
- Lee, M.S., K. Hanspers, C.S. Barker, A.P. Korn, ja J.M. McCune. 2004. Gene expression profiles during human CD4+ T cell differentiation. *Int Immunol.* 16:1109-1124.
- Lee G, Santat LA, Chang MS, Choi S. 2009. RNAi methodologies for the functional study of signaling molecules. *PLoS One.* 4(2):e4559.
- Leung RK, Whittaker PA. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther.* 107(2):222-39.
- Lund, R., H. Ahlfors, E. Kainonen, A.M. Lahesmaa, C. Dixon, ja R. Lahesmaa. 2005. Identification of genes involved in the initiation of human Th1 or Th2 cell commitment. *Eur J Immunol.* 35:3307-3319.
- Manetti, R., F. Gerosa, M.G. Giudizi, R. Biagiotti, P. Parronchi, M.P. Piccinni, S. Sampognaro, E. Maggi, S. Romagnani, ja G. Trinchieri. 1994. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med.* 179: 1273-1283.
- Martinet, W., D.M. Schrijvers, ja M.M. Kockx. 2003. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett.* 25:1025-1029.
- Mayer, K., E. Wolff, H. Clevers, ja W.G. Ballhausen. 1995. The human high mobility group (HMG)-box transcription factor TCF-1: novel isoforms due to alternative splicing and usage of a new exon IXA. *Biochim Biophys Acta.* 1263:169-172.
- Miosge L, Zamoyska R. 2007. Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr Opin Immunol.* 19(2):194-9.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, ja R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136:2348-2357.
- Mosmann, T.R., ja S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 17:138-46.
- Mullen, A.C., F.A. High, A.S. Hutchins, H.W. Lee, A.V. Villarino, D.M. Livingston, A.L. Kung, N. Cereb, T.P. Yao, S.Y. Yang, ja S.L Reiner. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science.* 292:1907-1910.
- Mulroy, T., J.A. McMahon, S.J. Burakoff, A.P. McMahon, ja J. Sen. 2002. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol.* 32:967-971.
- Noble JA, White AM, Lazzeroni LC, Valdes AM, Mirel DB, Reynolds R, Grupe A, Aud D, Peltz G, Erlich HA. 2003. A polymorphism in the TCF7 gene, C883A, is associated with type 1 diabetes. *Diabetes.* 52(6):1579-82.
- Novak, A., ja S. Dedhar. 1999. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci.* 56:523-537.



- Okamura, R.M., M. Sigvardsson, J. Galceran, S. Verbeek, H. Clevers, ja R. Grosschedl. 1998. Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity*. 8:11-20.
- Oosterwegel, M., M. van de Wetering, D. Dooijes, L. Klomp, A. Winoto, K. Georgopoulos, F. Meijlink, and H. Clevers. 1991. Cloning of murine TCF-1, a T cell-specific transcription factor interacting with functional motifs in the CD3-epsilon and T cell receptor alpha enhancers. *J Exp Med*. 173:1133-1142.
- Oosterwegel, M., M. van de Wetering, J. Timmerman, A. Kruisbeek, O. Destree, F. Meijlink, and H. Clevers. 1993. Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development*. 118:439-448.
- Pavan Kumar P, Purbey PK, Sinha CK, Notani D, Limaye A, Jayani RS, Galande S. 2006. Phosphorylation of SATB1, a global gene regulator, acts as a molecular switch regulating its transcriptional activity in vivo. *Mol Cell*. 22(2):231-43.
- Presky, D.H., H. Yang, L.J. Minetti, A.O. Chua, N. Nabavi, C. Wu, M.K. Gately, ja U. Gubler. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two  $\beta$ -type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14002-14007.
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. 19(21):2619-27.
- Rodewald, H. 1995. Pathways from hematopoietic stem cells to thymocytes. *Curr Opin Immunol*. 7:176-187.
- Rogge, L., A. Papi, D.H. Presky, M. Biffi, L.J. Minetti, D. Miotto, C. Agostini, G. Semenzato, L.M. Fabbri, ja F. Sinigaglia. 1999. Antibodies to the IL-12 Receptor  $\beta$ 2 Chain Mark Human Th1 But Not Th2 Cells In Vitro and In Vivo. *J Immunol*. 162:3926-3932.
- Romagnani, S. 1996. Th1 and Th2 in Human Diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 80:225-35.
- Rothenberg, E.V., ja T. Taghon. 2005. Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol*. 23:601-49.
- Rothenberg, E.V., J.E. Moore, ja M.A. Yui. 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol*. 8:9-21.
- Schilham, M.W., ja H. Clevers. 1998. HMG box containing transcription factors in lymphocyte differentiation. *Semin Immunol*. 10:127-132.
- Schilham, M.W., A. Wilson, P. Moerer, B.J. Benaissa-Trouw, A. Cumano, ja H.C. Clevers. 1998. Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunol*. 161:3984-3991.
- Schindler C, Kashleva H, Pernis A, Pine R, Rothman P. 1994. STF-IL-4: a novel IL-4-induced signal transducing factor. *EMBO J*. 13(6):1350-6.
- Soroosh P, Doherty TA. 2009. Th9 and allergic disease. *Immunology*. 127(4):450-8.
- Staal, F.J., ja H. Clevers. 2000. Tcf/Lef transcription factors during T-cell development: unique and overlapping functions. *Hematol J*. 1:3-6.
- Staal, F.J., J. Meeldijk, P. Moerer, P. Jay, B.C. van de Weerdt, S. Vainio, G.P. Nolan, ja H. Clevers. 2001. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol*. 31:285-293.
- Sui, G., C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W.C. Forrester, ja Y. Shi. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:5515-5520.

- Swain, S.L., A.D. Weinberg, M. English, ja G. Huston. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 145: 3796-3806.
- Szabo, S.J., A.S. Dighe, U. Gubler, ja K.M. Murphy. 1997. Regulation of the Interleukin (IL)-12R $\beta$ 2 Subunit Expression in Developing T Helper 1 (Th1) and Th2 Cells. *J Exp Med.* 185:817-824.
- Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, ja L.H. Glimcher. 2000. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell.* 100:655-669.
- Szabo, S.J., B.M. Sullivan, C. Stemmann, A.R. Satoskar, B.P. Sleckman, ja L.H. Glimcher. 2002. Distinct Effects of T-bet in Th1 Lineage Commitment and IFN- $\gamma$  Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science.* 295: 338-342.
- Tahvanainen, J., M. Pykäläinen, T. Kallonen, H. Lähteenmäki, O. Rasool, ja R. Lahesmaa. 2006. Enrichment of nucleofected primary human CD4<sup>+</sup> T cells: a novel and efficient method for studying gene function and role in human primary T helper cell differentiation. *J Immunol Methods.* 310:30-39.
- Ting, C.N., M.C. Olson, K.P. Barton, ja J.M. Leiden. 1996. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature.* 384:474-478.
- Tydell, C.C., E.S. David-Fung, J.E. Moore, L. Rowen, T. Taghon, ja E.V. Rothenberg. 2007. Molecular dissection of prethymic progenitor entry into the T lymphocyte developmental pathway. *J Immunol.* 179:421-438.
- van de Wetering, M., M. Oosterwegel, D. Dooijes, ja H. Clevers. 1991. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* 10:123-132.
- van de Wetering, M., M. Oosterwegel, F. Holstege, D. Dooyes, R. Suijkerbuijk, A. Geurts van Kessel, ja H. Clevers. 1992. The human T cell transcription factor-1 gene. Structure, localization, and promoter characterization. *J Biol Chem.* 267:8530-8536.
- van de Wetering, M., J. Castrop, V. Korinek, ja H. Clevers. 1996. Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Mol Cell Biol.* 16:745-752.
- van de Wetering, M., W. de Lau, ja H. Clevers. 2002. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell.* 109 Suppl:S13-19.
- van Noort, M., ja H. Clevers. 2002. TCF Transcription Factors, Mediators of Wnt-Signaling in Development and Cancer. *Dev Biol.* 244:1-8.
- Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 1998 Dec;16(6):651-9.
- Verbeek, S., D. Izon, F. Hofhuis, E. Robanus-Maandag, H. te Riele, M. van de Wetering, M. Oosterwegel, A. Wilson, H.R. MacDonald, ja H. Clevers. 1995. An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature.* 374:70-74.
- Weerkamp, F., M.R. Baert, B.A. Naber, E.E. Koster, E.F. de Haas, K.R. Atkuri, J.J. van Dongen, L.A. Herzenberg, ja F.J. Staal. 2006. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3322-3326.
- Willinger, T., T. Freeman, M. Herbert, H. Hasegawa, A.J. McMichael, ja M.F. Callan. 2006. Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo. *J Immunol.* 176:1439-1446.
- Ye M, Graf T. 2007. Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol.* 19(2):123-8.

Yssel H, De Vries JE, Koken M, Van Blitterswijk W, Spits H. 1984. Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J Immunol Methods*. 72(1):219-27.

Zaragosi, L.E., N. Billon, G. Ailhaud, ja C. Dani. 2007. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*. 25:790-797.

Zheng, W., ja R.A. Flavell. 1997. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*. 89:587-596.

Zhou L, Chong MM, Littman DR. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 30(5):646-55.

Zúñiga-Pflücker, J.C., H.L. Schwartz, ja M.J. Lenardo. 1993. Gene transcription in differentiating immature T cell receptor(neg) thymocytes resembles antigen-activated mature T cells. *J Exp Med*. 178:1139-1149.

## Internet-lähteet

Applied Biosystems: User Bulletin #2, katsottu 3.7.2008

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_040980.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf)

Applied Biosystems: Real-time PCR systems, Chemistry guide. Katsottu 21.11.2009

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_041440.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041440.pdf)

UniProtKB: proteiinitietokanta, katsottu 15.8.2008

<http://www.uniprot.org/>