

Estrogeenireseptorien ligandien vaikutus T-soluihin

Karoliina Suominen

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto

Biologian laitos

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti
tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

SUOMINEN, KAROLIINA: Estrogeenireseptorien ligandien vaikutus T-soluihin

Pro Gradu -tutkielma, 51 s., 4 liites.

Eläinfysiologia ja genetiikka

Tammikuu 2020

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Estrogeenit ovat steroideihin kuuluvia sukupuolihormoneita, joiden vaikutukset välittyvät enimmäkseen kahden estrogeenireseptorin ER α :n ja ER β :n kautta. Estrogeenit säätelevät sukupuoliominaisuuksien lisäksi sydän- ja verenkiertojärjestelmän, keskushermoston ja luuston toimintaa naisilla ja miehillä. Estrogeenit säätelevät myös ihmisen immuunijärjestelmää. Ne vaikuttavat esimerkiksi T-solujen kehitykseen ja aktivaatioon ja ohjaavat T-soluja erilaistumaan eri alatyyppeikseen, kuten regulatorisiksi T-soluiksi. Estrogeeneillä voi olla vaikutusta myös autoimmuunisairauksien puhkeamiseen ja etenemiseen, sillä naiset sairastuvat autoimmuunisairauksiin useammin kuin miehet. Lisäksi naisten autoimmuunisairauksien oireet muuttuvat kuukautiskierron ja raskauden aikana, jolloin elimistön estrogeenipitoisuuksissa tapahtuu suuria muutoksia.

Selektiiviset estrogeenireseptorien modulaattorit (SERM) ovat estrogeenireseptoreihin sitoutuvia yhdisteitä, joiden vaikutukset vaihtelevat agonistisesta antagonistiseen kohdekudosten mukaan. SERMejä käytetään esimerkiksi osteoporoosin hoitoon ja ehkäisyyn sekä syövän hormonaaliseen hoitoon. SERMien vaikutuksia immuunijärjestelmään ei täysin tunneta, mutta joillakin yhdisteillä on todettu olevan siihen vaikuttavia ominaisuuksia.

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin estrogeenisten yhdisteiden vaikutusta T-solujen aktiivisuuteen ja toimintaan Jurkat-soluilla. Erityisenä mielenkiinnon kohteena oli regulatoriseen fenotyyppiin liittyvät muutokset. Tulosten perusteella 17 β -estradioli (E2) ja raloksifeeni ylläpitävät Jurkat-solujen elinkelpoisuutta ja estrogeeniset vaikutukset ovat mahdollisesti riippuvaisia ER β - tai GPER1-aktivaatiosta näissä soluissa. Estrogeeniset yhdisteet eivät ohjanneet Jurkat-soluja kohti T-solujen regulatorista fenotyyppiä ja E2 ja raloksifeeni jopa vähensivät anti-inflammatorisen IL-10:n lähetti-RNA:n ilmenemistä.

Uuden SERM2:n vaikutukset Jurkat-soluihin vaikuttavat olevan antagonistisia toisin kuin E2:lla ja raloksifeenillä. Tulos tukee tutkimusryhmän aikaisempia johtopäätöksiä, joiden mukaan SERM2:n vaikutukset rajoittuvat systeemisten vaikutusten sijaan tiettyihin kudoksiin ja solutyyppeihin.

ASIASANAT: estrogeenit, reseptorit, T-solu, autoimmuunisairaudet, SERM, raloksifeeni

UNIVERSITY OF TURKU

Department of Biology

SUOMINEN, KAROLIINA:

The effects of estrogen receptor ligands on T cells

Master's thesis, 51 pages, 4 appendices

Animal physiology and genetics

January 2020

The originality of this thesis has been checked in accordance with the University of Turku quality assurance system using the Turnitin OriginalityCheck service.

Estrogens are steroids that act as sex hormones. They not only regulate the sexual characteristics, but also affect the coronary system, central nervous system and bone in men and female. The effects of estrogens are mainly conveyed through two estrogen receptors, ER α and ER β . Estrogen receptors are expressed by the cells of the immune system, and estrogens are known to affect T cell development and activation. Additionally, they can guide T cells towards different subtypes, such as regulatory T cells. Estrogens likely affect the onset and progression of autoimmune diseases, since the prevalence of such diseases is higher in women than in men. Women's symptoms also change during menstrual cycle and pregnancy, when estrogen concentrations vary.

Selective estrogen modulators (SERMs) are estrogen receptor binding compounds that act as agonists or antagonists depending on target tissue. SERMs are used to treat and prevent osteoporosis and to treat hormone responsive cancers. The effects on the immune system are still partially unknown, although some compounds are shown to affect the immune system.

The aim of this study was to examine the effects of estrogenic compounds on T cell activity and function using Jurkat cells. We were especially interested in changes associated with regulatory phenotype. According to the results, 17 β -estradiol (E2) and Raloxifene support Jurkat cells viability, and the estrogenic effects may depend on ER β or GPER1 activation in these cells. Estrogenic compounds did not affect Jurkat cell differentiation towards regulatory T cell phenotype. In fact, E2 and Raloxifene lowered the messenger RNA expression of anti-inflammatory IL-10.

The ER β dependent effects of a novel SERM2 seem to differ from those of E2 and Raloxifene. The results support our research groups earlier conclusion that SERM2 acts on specific tissue and cell types, rather than on systemic level.

KEYWORDS: estrogens, receptor, T cell, autoimmune disease, SERM, Raloxifene

Sisällys

LYHENTEET.....	1
1 Johdanto.....	1
1.1 Estrogeenit ja estrogeenisignalointi.....	1
1.1.1 Estrogeenireseptorit.....	2
1.1.2 Genominen signalointireitti.....	3
1.1.3 Ei-genominen signalointireitti ja ligandista riippumaton signalointi.....	4
1.2 Estrogeenit ja T-solut.....	5
1.2.1 T-solujen kehitys.....	5
1.2.2 T-solujen aktivaatio.....	7
1.2.3 T-solujen erilaistuminen ja sytokiinituotanto.....	9
1.2.4 Regulatoriset T-solut.....	10
1.3 Estrogeenit ja autoimmuunisairaudet.....	11
1.3.1 Estrogeenien T-soluvälitteiset vaikutukset autoimmuunisairauksissa.....	12
1.4 Selektiiviset estrogeenireseptorin modulaattorit.....	14
1.4.1 SERMit ja T-solut.....	15
1.5 Progesteroni.....	16
1.5.1 Progesteroni ja immuunijärjestelmä.....	18
1.6 Työn tarkoitus.....	19
2 Aineisto ja menetelmät.....	21
2.1 Käytetty solulinja ja kasvuolosuhteet.....	21
2.2 Virtaussytometria.....	21
2.2.1 Jurkat-solujen proteiiniekspression tutkiminen.....	22
2.3 Solujen elinkelpoisuuden mittaaminen.....	23
2.4 Kvantitatiivinen polymeerasireaktio.....	24
2.4.1 RNA:n eristys.....	25
2.4.2 cDNA-synteesi ja qPCR-ajot.....	25
2.5 Interleukiini 2:n kvantitointi ELISA-menetelmällä.....	26
3 Tulokset.....	27
3.1 SERMit eivät muuta Jurkat-solujen fenotyyppiä.....	27
3.2 Raloksifeeni ja E2 ylläpitävät solujen elinkelpoisuutta.....	29
3.3 Estrogeeniset vaikutukset ovat mahdollisesti ER β - tai GPER-välitteisiä.....	30
3.4 SERMien vaikutus Jurkat-solujen aktivaatioon.....	31

3.5	E2 ja raloksifeeni vähensivät IL-10:n lähetti-RNA:n määrää.....	33
4	Tulosten tarkastelu	34
4.1	Jurkat-solujen aktivaatio saattaa muuttaa niiden metaboliaa	34
4.2	E2 ja raloksifeeni parantavat Jurkat-solujen selviytymistä.....	35
4.3	Estrogeeniset vaikutukset T-solujen metaboliaan saattavat olla ER β -välitteisiä	36
4.4	Estrogeeniset yhdisteet eivät ohjaa Jurkat-soluja kohti regulatorista fenotyyppiä.....	37
4.5	Estrogeeniset yhdisteet eivät vaikuta IL-2:n tai sen reseptorin ilmenemiseen Jurkat-soluissa.....	38
4.6	E2 vähentää anti-inflammatorisen IL-10:n ilmenemistä Jurkat-soluissa.....	39
4.7	Yhteenveto	40
5	Lähteet	41

LYHENTEET

AF	Transaktivaatioalue <i>engl.</i> Activating function
APC	Antigeeniä esittelevä solu <i>engl.</i> Antigen presenting cell
CCL	C-C –motiivi –luokkaan kuuluva kemokiiniligandi <i>engl.</i> Chemokine C-C-motif ligand
CD	CD-molekyylirakenne <i>engl.</i> Cluster of differentiation
cDNA	Komplementaarinen DNA <i>engl.</i> Complementary DNA
CREM	Syklisen AMP-vaste-elementin modulaattori <i>engl.</i> cAMP responsive element modulator
DBD	DNA:ta sitova alue <i>engl.</i> DNA-binding domain
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
E1	Estroni
E2	Estradioli (17 β -estradioli)
E3	Estrioli
EAU	Autoimmuunisen uveoretiniitin eläinmalli <i>engl.</i> Experimental autoimmune uveoretinitis
ERE	Estrogeenivaste-elementti <i>engl.</i> Estrogen-response element
FBS	Naudan sikiön seerumi <i>engl.</i> Fetal bovine serum
FC	Vasta-aineen kiteytyvä osa, johon FC-reseptori sitoutuu <i>engl.</i> Fragment, crystallizable
FCS	Pienen kulman sironta <i>engl.</i> Forward scatter
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto <i>engl.</i> U.S. food and drug administration
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi <i>engl.</i> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IBD	Krooninen tulehduksellinen suolistosairaus <i>engl.</i> Inflammatory bowel disease
IFN γ	Interferoni gamma
IL	Interleukiini
IL-2R	Interleukiini 2 reseptori
LBD	Ligandia sitova alue <i>engl.</i> Ligand binding domain
MAPK	Mitogeenilla aktivoituva proteiinikinaasi
mER	Solukalvolla oleva estrogeenireseptori <i>engl.</i> Membrane estrogen receptor
MHC	MHC-proteiini <i>engl.</i> Major histology complex
mPR	Solukalvolla oleva progesteronireseptori <i>engl.</i> Membrane progesterone receptor
MRL lpr	SLE:n hiirimalli

mRNA	Lähettilä-RNA <i>engl.</i> Messenger RNA
MS	Multippeliskleroosi <i>engl.</i> Multiple sclerosis
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos <i>engl.</i> Phosphate-buffered saline
PCR	Polymeraasiketjureaktio <i>engl.</i> Polymerase chain reaction
PHA	Fytohemagglutiniini <i>engl.</i> Phytohemagglutinin
PI3K	Fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi
PMA	Forboli-12-myristaatti-13-asetaatti <i>engl.</i> Phorbol 12-myristate 13-acetate
PR	Progesteronireseptori <i>engl.</i> Progesterone receptor
qPCR	Kvantitatiivinen PCR <i>engl.</i> Quantitative polymerase chain reaction
RA	Nivelreuma <i>engl.</i> Rheumatoid arthritis
RAL	Raloksifeeni <i>engl.</i> Raloxifene
SERM	Selektiivinen estrogeenireseptorin modulaattori <i>engl.</i> Selective estrogen receptor modulator
SERM2	Forendo Pharman kehittämä SERM-yhdiste
SLE	Systeminen lupus erythematosus <i>engl.</i> Systemic lupus erythematosus
SSC	Sivusironta <i>engl.</i> Side scatter
TCR	T-solureseptori <i>engl.</i> T cell receptor
TGFβ	Transformoiva kasvutekijä beeta <i>engl.</i> Transforming growth factor beta
Th-solu	T-auttajasolu <i>engl.</i> T-helper cell
TNF	Kasvainnekroositekijä <i>engl.</i> Tumour necrosis factor
Treg-solu	Regulatorinen eli säätelijä T-solu <i>engl.</i> Regulatory t cell
UPP	Ubikitiini-proteasomi-signaalintireitti <i>engl.</i> Ubiquitin-proteasome pathway

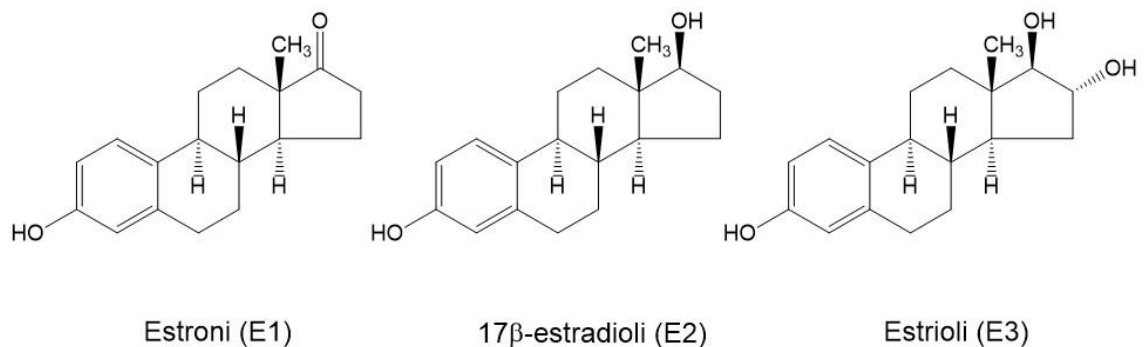
Tekstissä esiintyvien geenien ja niiden koodaamien proteiinien nimet ja lyhenteet

Geenin symboli	Koodattavan proteiinin nimi ja lyhenne
<i>AIRE</i>	Autoimmuuniteetin säätelijä / AIRE-geeni
<i>CCL5</i>	CCL5
<i>ESR1</i>	Estrogeenireseptori alfa, ER α
<i>ESR2</i>	Estrogeenireseptori beeta, ER β
<i>FOXP3</i>	Forkhead box P3 -transkriptiotekijä, FOXP3
<i>GPER1</i>	G-proteiinikytketty estrogeenireseptori, GPER1
<i>IFNG</i>	Interferoni gamma, IFN γ
<i>IL10</i>	Interleukiini 10, IL-10
<i>IL17A</i>	Interleukiini 17, IL-17
<i>IL1B</i>	Interleukiini 1, IL-1 β
<i>IL2</i>	Interleukiini 2, IL-2
<i>IL4</i>	Interleukiini 4, IL-4
<i>IL5</i>	Interleukiini 5, IL-5
<i>IL6</i>	Interleukiini 6, IL-6
<i>PGR</i>	Progesteronireseptori, PR
<i>TGFB1</i>	Transformoiva kasvutekijä beeta, TGF β
<i>TNF</i>	Kasvainnekroositekijä alfa, TNF α

1 Johdanto

1.1 Estrogeenit ja estrogeenisignointi

Elimistön tuottamat luonnolliset estrogeenit ovat steroidihormoneja, joita steroideja tuottavat eli steroidogeeniset solut syntetisoivat kolesterolista monivaiheisessa prosessissa (Strauss & FitzGerald 2019). Luonnollisiin estrogeeneihin lukeutuvat estroni (E1), 17 β -estradioli (E2) ja estrioli (E3) (kuva 1). Estrogeeneista E2 on biologisesti aktiivisin (Heldring ym. 2007). E1:n aktiivisuus on hieman E2:ta alhaisempi, ja E3 on näistä kolmesta estrogeenista heikoin (Stanczyk 2000).



Kuva 1. Elimistön tuottamien luonnollisten estrogeenien estronin, 17 β -estradiolin ja estriolin kemialliset rakenteet. (Muokattu kohteesta Norman & Henry 2015).

Naisilla E2 tuotetaan pääasiassa munasarjoissa, joissa estrogeenisynteesi alkaa teekasoluissa androgeenisynteesillä ja päättyy granuloosasoluissa kun aromataasientsyymi muuttaa androgeenin estrogeeniksi (Simpson 2003). Miehillä E2:ta syntetisoivat kivesten Leydigin ja Sertolin solut sekä spermatoosyytit. Estrogeenejä syntetisoidaan myös sukupuolirauhasten ulkopuolella, kuten aivoissa, rasvakudoksessa, lisämunuaisen kuorikerroksessa, ihossa ja haimassa (Barakat ym. 2016). Suurin osa E1:stä ja E3:sta muodostetaan maksassa E2:sta (Gruber ym. 2002). Raskauden aikainen E3:n tuotto tapahtuu synsytiotrofoblastissa eli istukan nukkalisäkkeiden pintakerroksessa (Siiteri & MacDonald 1966). Syntetisointikudoksesta riippuen estrogeenit toimivat systeemisesti endokriinisina signaalintimolekyyleinä eli kulkeutuvat verenkierron mukana kohdesoluihin tai ne toimivat paikallisesti parakriinisina, autokriinisina tai intrakriinisina tekijöinä (Vrtačnik ym. 2014).

Estrogeeneja on yleisesti pidetty naishormoneina, sillä ne vastaavat naisten sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehityksestä ja säätelevät muun muassa kuukautiskiertoa sekä kohdun limakalvon toimintaa. Sukupuoliominaisuuksien lisäksi estrogeenit välittävät useita biologisia vaikutuksia sydän- ja verenkiertojärjestelmässä,

immuunijärjestelmässä, keskushermostossa ja luustossa. Viime vuosikymmenellä tehdyt tutkimukset ovat korostaneet estrogeenien osuutta myös miesten hyvinvoinnissa. Smith ym. (2008) raportoivat miespotilaasta, jolta tunnistettiin ituradan estrogeenireseptori α :a koodaavassa geenissä sen toiminnan hävittävä mutaatio (*engl.* Loss of function). Geenin mutaatio aiheutti miespotilaalla estrogeenisignaloinnin häiriintymisen, mikä johti muun muassa luuntiheyden alenemiseen (osteopenia), hohkaluun määrän vähenemiseen ja luiden ohenemiseen (Smith ym. 2008). Tutkimuksissa on havaittu, että myös estrogeenin synteesiä katalysoivan aromataasientsyymin geenissä tapahtuva geenin toimintaa inaktivoiva mutaatio johtaa erilaisiin terveysongelmiin, koska E2:ta ei muodostu normaalisti (Zirilli ym. 2008).

1.1.1 Estrogeenireseptorit

Estrogeenien fysiologiset vaikutukset välittyvät suurilta osin kahden estrogeenireseptorin ER α :n ja ER β :n (*engl.* Estrogen receptor, ER) kautta. ER α ja ER β ovat tumareseptorien suurperheeseen kuuluvia proteiineja, joita koodaavat eri kromosomeissa sijaitsevat geenit *ESR1* (ER α) ja *ESR2* (ER β). Reseptorien alatyypeillä on tumareseptorien yleinen viisiosainen rakenne (kuva 2) (Khan & Ahmed 2015). Estrogeenireseptoreissa on DNA:ta sitova alue (*engl.* DNA-binding domain, DBD), sarana-alue (*engl.* Hinge domain) ja ligandia sitova alue (*engl.* Ligand binding domain, LBD). Näiden lisäksi reseptorien aminoterminaaliosassa (NH₂) päässä on AF-1- ja karboksyyli-terminaaliosassa (COOH) päässä on AF-2-transaktivaatioalueet. ER α :n ja ER β :n DNA:ta sitovat alueet ovat hyvin samankaltaisia, mutta reseptorien muiden alueiden homologia on vähäisempää (Gruber ym. 2002).



Kuva 2. Tumareseptoreihin kuuluvien estrogeenireseptorien ER α :n ja ER β :n rakenne. Ylimpänä on esitetty tumareseptorien yleinen nimeämiskäytäntö rakenteisiin A – F. ER α :n ja ER β :n rakennekuviin on merkitty estrogeenireseptoreille ominaiset rakenteet: transaktivaatioalueet (AF-1/2), DNA:ta sitova alue (DBD), sarana-alue (H) ja ligandia sitova alue (LBD). (Muokattu kohteesta Khan & Ahmed 2015).

Eri solutyypit ilmentävät estrogeenireseptoreita useissa eri kudoksissa, kuten lisääntymiselimistön kudoksissa, sydän- ja verenkiertojärjestelmässä,

keskushermostossa ja luustossa (Paterni ym. 2014). Tämän lisäksi estrogeenireseptoreita ilmentävät myös useimmat synnynnäisen ja hankitun immuunipuolustuksen solut, kuten T- ja B-solut, monosyytit sekä dendriittisolut (Moulton 2018). CD4⁺ T-solut ilmentävät paljon ER α :aa ja vähän ER β :aa, kun taas CD8⁺ T-solut ilmentävät hieman kumpaakin reseptoria (Phiel ym. 2005).

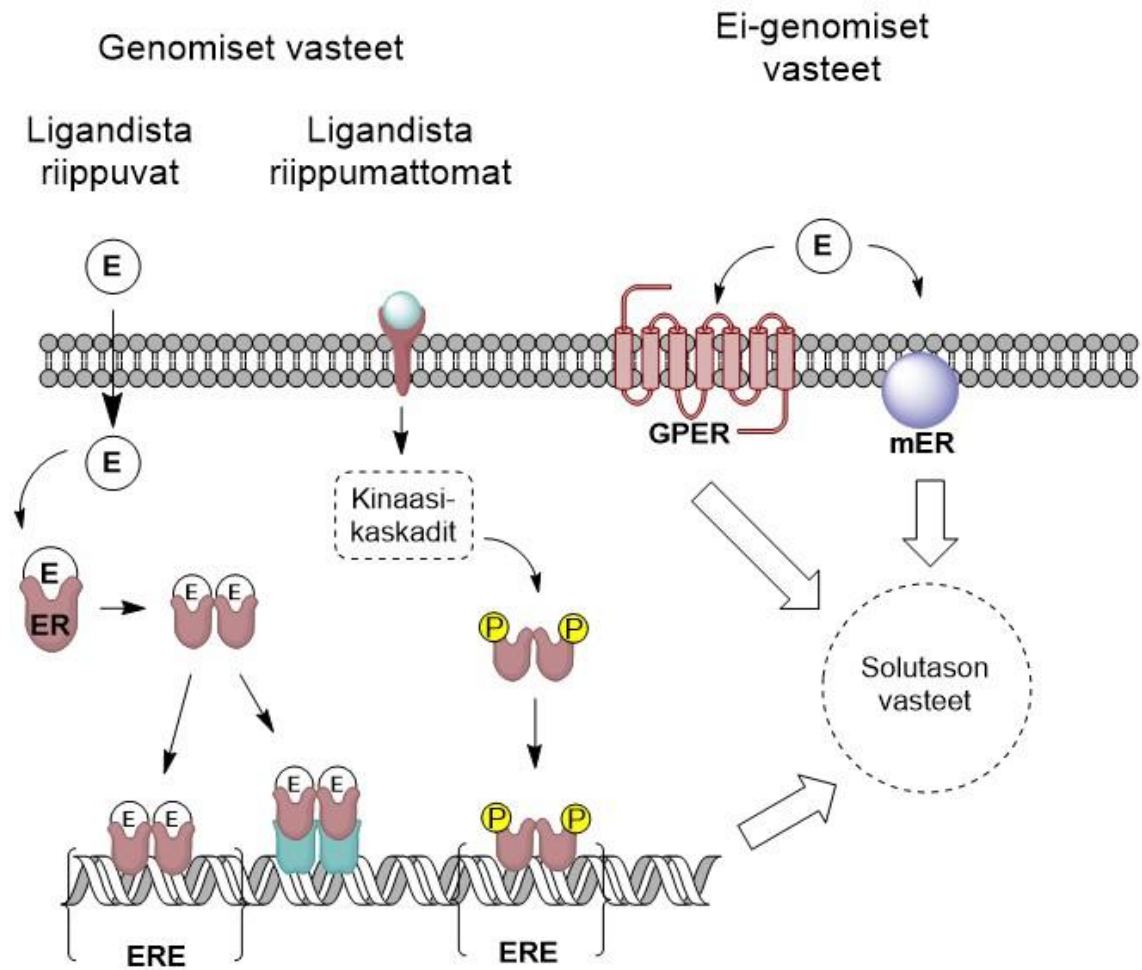
ER α :n ja ER β :n välittämät vasteet poikkeavat huomattavasti toisistaan. Reseptorit säätelevät toisistaan riippumattomia kohdegeenejä, ja reseptorit voivat säädellä saman geenin transkriptiota eri tavalla (Fox ym. 2008). Erilaisia vasteita selittävät myös vaihtelut reseptorien määrissä ja jakaumissa eri kudosten ja solujen välillä (Khan & Ahmed 2015), sekä reseptorien toisistaan poikkeavat vaihtoehdot proteiinisekvenssit eli isoformit (Herynk & Fuqua 2004).

1.1.2 Genominen signalointireitti

Estrogeenisignaloinnin klassisena vaikutusmekanismina pidetään genomista signalointireittiä, jossa E2-ER-kompleksi toimii transkriptiota aktivoivana tekijänä sitoutumalla suoraan DNA:han (kuva 3). Klassinen signalointireitti käynnistyy, kun estrogeeni diffundoituu solukalvon läpi ja sitoutuu sytoplasmassa estrogeenireseptoriin (ER). Ligandin sitoutuminen reseptorin LBD-alueeseen aiheuttaa ER:n konformaatiomuutoksen ja reseptorien homo- tai heterodimerisaation (Khan & Ahmed 2015; Thomas & Gustafsson 2011). ER-dimeerit kuljetetaan tumaan, missä ne sitoutuvat DNA:han kohdegeeniensä positiivisille tai negatiivisille ERE-alueiksi (*engl.* Estrogen-response element) kutsutuille vastealueille. ER:ien sitoutuminen DNA:han indusoi muiden kohdegeenien transkriptiota estävien tai aktivoivien proteiinien sitoutumisen säätelyalueille. DNA:han sitoutunutta estrogeenireseptori-ligandikompleksia muokataan translaation jälkeen tapahtuvilla modifikaatioilla, kuten metylaatiolla ja asetylaatiolla. Muokkaukset edistävät kompleksin hajoamista (dissosiaatio), minkä lisäksi reseptorien ubiquitinaatio joko edelleen aktivoi reseptoreita tai johtaa niiden pilkkoutumiseen (degradaatio) (Heldring ym. 2007). Estrogeeni pystyy myös yksinään aktivoimaan ubiquitiini-proteasomi-signalointireitin (*engl.* Ubiquitin-proteasome pathway, UPP), joten se voi säädellä ainakin ER α :n translaation jälkeen tapahtuvaa muokkausta ja hajotusta (Moulton 2018).

Estrogeenireseptorien indusoima genominen signalointi voi tapahtua myös epäsuorasti (Vrtačnik ym. 2014) (kuva 3), mikä mahdollistaa myös tiettyjen geenien transkription säätelyn estrogeenillä, vaikka geenin säätelyalueella ei ole ERE-aluetta. Tässä

tilanteessa E2-ER-kompleksi sitoutuu geenien säätelyalueen DNA:han välillisesti muiden transkriptiotekijöiden kautta (Vrtačnik ym. 2014) (kuva 3).



Kuva 3. Solutasolla tapahtuvan estrogeenisignaloinnin mekanismeja. Estrogeenit (E) välittävät ligandista riippuvaisia genomisia vasteita sitoutumalla DNA:ssa estrogeenireseptorien vastealueille (ERE) tai muualle DNA:han muiden transkriptiotekijöiden välillä. Ligandista riippumattomassa signaloinnissa fosforyloitu estrogeenireseptori (ER) sitoutuu DNA:han. Estrogeenien genomien kautta kulkemattomat vasteet tapahtuvat esimerkiksi solukalvolle assosioituneiden reseptorien kautta (GPER ja mER). (Muokattu kohteesta Moulton 2018).

1.1.3 Ei-genominen signaalintireitti ja ligandista riippumaton signointi

Nopeita ei-genomisia vasteita välittävät klassisen solunsisäisen ER:n lisäksi myös solukalvolla oleva estrogeenireseptori (*engl.* Membrane estrogen receptor, mER) (Moulton, 2018) ja solukalvoon liittyvä G-proteiinikytkentäinen estrogeenireseptori (*engl.* G-protein coupled estrogen receptor, GPER) (kuva 3) (Revankar ym. 2005). 17 β -estradiolin ei-genomisiin vasteisiin lukeutuvat muun muassa solunsisäisten kalsiumvarastojen mobilisaatio (Improta-Brears ym. 1999), adenylaattisyklaasin

aktivaation lisääminen ja tästä seuraavan syklisen AMP:n tuotto (Aronica ym. 1994), sekä MAPK-signalointireitin aktivaatio (Lösel & Wehling 2003).

Aktivoituneet mER ja GPER vaikuttavat myös immuunisolureseptorien, kuten B-solureseptorin solunsisäisiin signalointireitteihin. Vaikutukset näkyvät sytoplasmassa esimerkiksi kohonneina kalsiumtasoina, mikä on seurausta G-proteiinien välityksellä aktivoituneen fosfolipaasi C:n pilkkomien signaalimolekyylien toiminnasta (Moulton 2018).

Estrogeenireseptorien tai niiden kanssa vuorovaikuttavien proteiinien eli niin sanottujen koregulaattorien fosforylointi voi johtaa ligandista riippumattomaan ER-aktivaatioon (kuva 3). Ilmiön taustalla toimivat muun muassa solujen yleistä fosforylaatiotasoa säätelevät proteiinikinaasit A ja C, solusykliä säätelevät proteiinit sekä solunulkoiset signaalit, kuten peptidikasvutekijät, sytokiinit ja hermovälittäjäaineet (Nilsson ym. 2001).

1.2 Estrogeenit ja T-solut

Estrogeenit säätelevät muiden kohteidensa ohella myös ihmisen immuunijärjestelmää. Vastaavanlaista säätelyä tapahtuu muillakin selkärankaisilla, kuten kaloilla, mikä viittaa estrogeenireseptorien kautta tapahtuvan immuunijärjestelmän säätelyn olevan evolutiivisesti konservoitunut mekanismi (Szwejsjer ym. 2017). Immuunijärjestelmän estrogeeniriippuvainen säätely ulottuu aina immuunijärjestelmän solujen kehityksestä niiden toimintaan saakka.

1.2.1 T-solujen kehitys

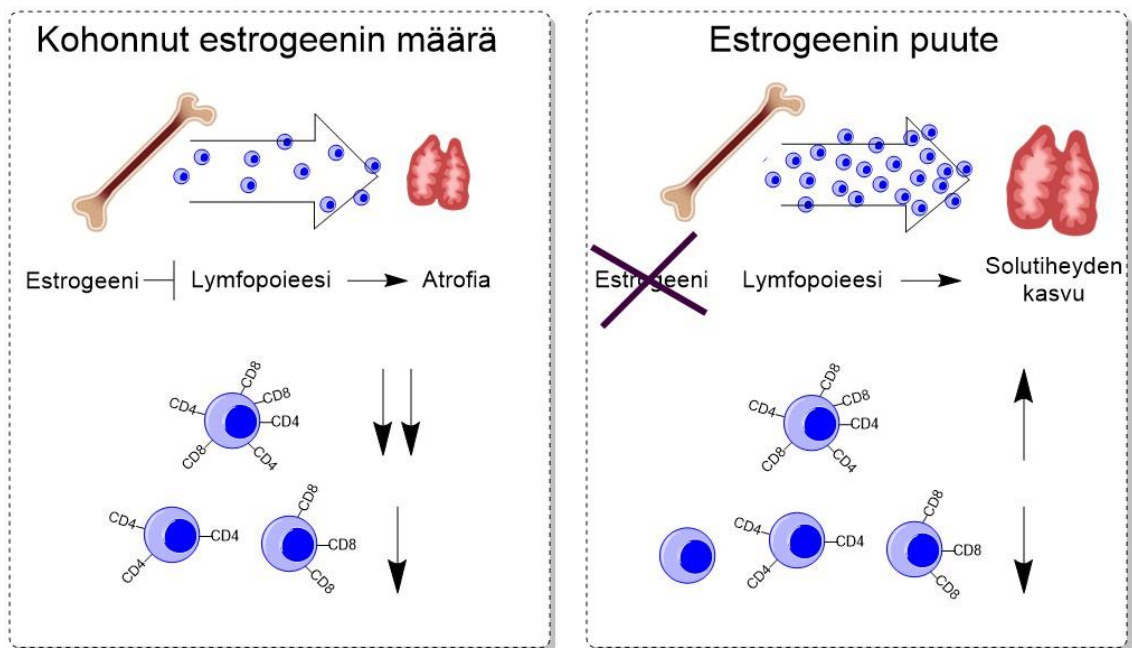
T-solujen esiastesolut kehittyvät hematopoieettisista kantasoluista sikiöaikana maksassa, mutta myöhemmin kehitys siirtyy luuytimeen. Esiastesoluista kehittyvät T-solut eli tymosyytit siirtyvät luuytimeestä kypsymään kateenkorvaan, missä T-solut alkavat ilmentää pinnallaan T-solureseptoria (*engl.* T cell receptor, TCR). Kateenkorvassa tapahtuu T-solureseptoria koodaavien geenisegmenttien uudelleenjärjestelyä eli rekombinaatiota. Koska rekombinaatio on sattumanvaraista, syntyy antigeenispesifisyydeltään vaihteleva T-solupopulaatio. Kateenkorvassa tapahtuvan kehityksen aikana T-solut alkavat ilmentää pinnallaan myös CD4- ja CD8-molekyylejä (*engl.* Cluster of differentiation, CD).

T-solujen kehityksen aikana T-solureseptorin toimivuutta testataan positiivisella ja negatiivisella valinnalla esittelemällä soluille peptidi-MHC-komplekseja (*engl.* Major

histology complex, MHC). Onnistunut sitoutuminen tekee soluista positiivisesti valikoituneita, kun taas epäonnistunut sitoutuminen ohjaa solut kuolemaan eli apoptoosiin. Liian voimakkaasti elimistön omien peptidien kanssa reagoineet tymosyytit valikoituvat negatiivisesti ja ajautuvat apoptoosiin. Negatiivisen valinnan tarkoituksena on poistaa autoreaktiiviset eli elimistön omiin rakenteisiin ja harmittomiin vieraisiin rakenteisiin reagoivat T-solut. Kateenkorvassa siis estetään sellaisten T-solujen pääsy elimistöön, jotka hyökkäävät elimistön omia antigeenejä vastaan. Kateenkorvassa tapahtuvaa T-solujen kehitystä haitallisia taudinaiheuttajia vastaan tehokkaasti reagoiviksi, mutta omia rakenteita sietäviksi soluiksi, kutsutaan sentraaliseksi toleranssiksi.

AIRE-geeni liittyy keskeisellä tavalla etenkin T-solujen kehityksen aikana muovautuvan toleranssin syntyyn. Puberteetin jälkeen *AIRE*-geenin ilmentämisessä tapahtuu sukupuolisdonnaisia muutoksia ainakin ihmisillä ja hiirillä, ja estrogeenin on huomattu vähentävän geenin ilmenemistä viljellyissä kateenkorvan soluissa (Moulton 2018). Tämän vuoksi estrogeeniriippuvainen T-solujen kehityksen säätely on oleellinen tapahtuma sentraalisen toleranssin ja näin myös autoimmunitietin kannalta.

Kehittyvät T-solut ja kateenkorvan epiteelisolut ilmentävät estrogeenireseptoreita (Savino ym. 2016). Reseptorien kautta estrogeenit vaikuttavat siihen, millaisia T-soluja kateenkorvassa kehittyä (kuva 4). Poikkeavat estrogeenipitoisuudet muuttavat kehittyvien T-solujen fenotyyppejä, ja estrogeenin puuttuessa suurin osa kehittyvistä tymosyyteistä on niin kutsuttuja tuplapositiivisia soluja eli ne ilmentävät pinnallaan sekä CD4- että CD8-molekyylejä (Leposavić ym. 1996). Samaan aikaan solujen, jotka eivät ilmennä kumpaakaan molekyyleä tai ilmentävät vain toista molekyyleä, osuus vähenee. Liiallinen estrogeenipitoisuus taas vähentää CD4⁺ ja CD8⁺ solujen suhteellista osuutta, minkä lisäksi CD4/CD8-tuplapositiivisten solujen määrä romahtaa (Rijhsinghani ym. 1996). Tuplapositiiviset T-solut on yhdistetty kroonisiin tulehdustiloihin ja autoimmuunisairauksiin (Parel & Chizzolini 2004) ja hiljattain julkaistun tutkimuksen mukaan tuplapositiiviset T-solut ohjaavat muiden T-solujen erilaistumista Th2-suuntaan eli vasta-aineentuotannon säätelyyn osallistuviksi soluiksi (Bohner ym. 2019).



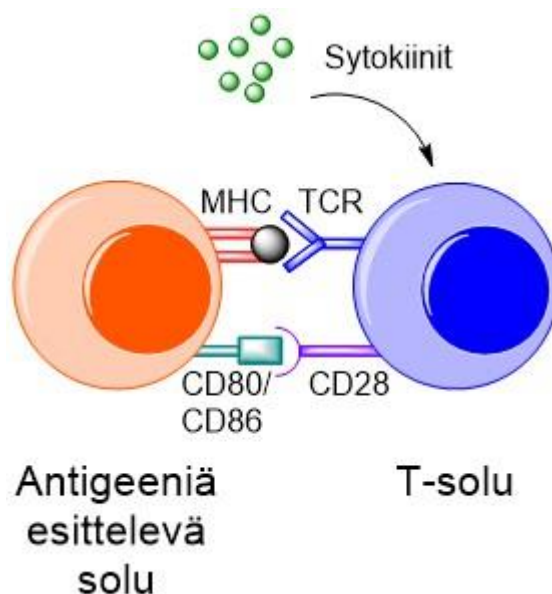
Kuva 4. Estrogeenin vaikutuksia T-solujen kehitykseen. Vasemmalla kohonneen estrogeenipitoisuuden vaikutuksia. Estrogeeni hillitsee T-solujen kehitystä eli lymfopoiesia ja proliferaatiota, ja alentunut solumäärä johtaa kateenkorvan atrofiaan. $CD4^+$ ja $CD8^+$ solujen määrä vähenee ja $CD4/CD8$ -tuplapositiivisten solujen määrä romahtaa. Oikealla estrogeenin puuttumisen vaikutuksia. Estrogeenin puuttuessa kehittyvien T-solujen määrä kasvaa, mikä johtaa myös kateenkorvan solutiheyden kasvuun. $CD4^+$, $CD8^+$ tai kumpaakaan CD -molekyyliä ilmentämättömien solujen määrä vähenee, mutta $CD4/CD8$ -tuplapositiivisten solujen määrä kasvaa. (Leposavić ym. 1996; Moulton 2018; Rijhsinghani ym. 1996; Zoller ym. 2006).

Estrogeenin vaikutukset heijastuvat kateenkorvaan myös kudostasolla (kuva 4). Estrogeenit hillitsevät T-solujen kehitystä eli lymfopoiesia (Moulton 2018) ja endogeenisen estrogeenin puuttuminen lisääkin kateenkorvan solutiheyttä (Leposavić ym. 1996). Korkea endogeeninen estrogeenitaso aiheuttaa päinvastaisesti kateenkorvan atrofiaa eli surkastumista. Atrofia johtuu tymosyyttien esiastesolujen vähentyneestä proliferaatiosta kateenkorvassa ja luuytimessä (Zoller ym. 2006).

1.2.2 T-solujen aktivaatio

Ennen kuin naiivit T-solut voivat toimia vaikuttaja- tai muistisoluina, niiden tulee aktivoitua (kuva 5). T-solujen täydellinen aktivaatio on riippuvainen kolmesta signaalista. Ensinnäkin T-solureseptorin tulee sitoutua antigeeniinsä, joka esitellään T-solulle antigeeniä esittelevän solun (*engl.* Antigen presenting cell, APC) MHC-molekyyliin sitoutuneena. Toiseksi, T-solut tarvitsevat kostimulatorisen signaalin eli signalointi muiden T-solun pinnan reseptorien kautta vahvistaa TCR:n välittämää aktivaatiota. Epätäydellinen stimulaatio, mikä johtuu yleensä kostimulaation puutteesta,

tekee T-soluista reagoimattomia ärsykkeille (anergia) tai ajaa ne apoptoosiin (Eagar & Miller 2019). Tämän säätelymekanismin tarkoitus on estää vääränlainen T-solujen aktivaatio ja säilyttää T-solujen toleranssi elimistön omia molekyyliä kohtaan. T-soluissa CD28 on tehokkain kostimulatorinen reseptori (Smith-Garvin 2009), ja se aktivoituu yleensä dendriittisolujen pinnalla olevilla CD80- tai CD86-proteiineilla. Kolmas täydelliseen aktivaatioon tarvittava signaali on T-solujen sytokiiniympäristö (Curtsinger ym.1999; Smith-Garvin ym. 2009).

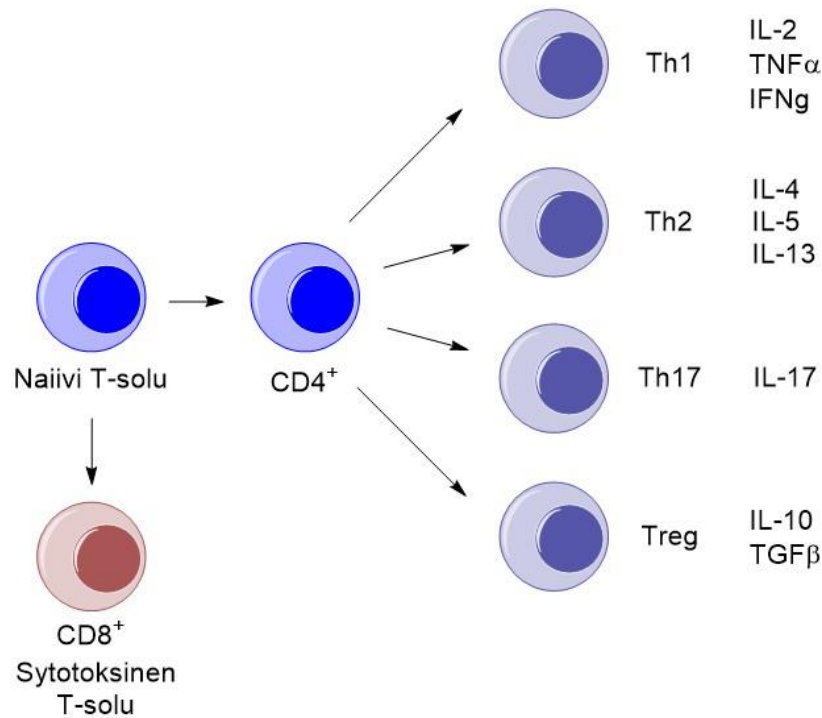


Kuva 5. Yksinkertaistettu kuva T-solujen aktivaatiosta antigeeniä esittelevän solun toimesta. T-solujen aktivaatio on riippuvainen kolmesta signaalista. Signaali 1: T-solureseptori (TCR) sitoutuu antigeeniin, joka on sitoutuneena MHC-molekyylin antigeeniä esittelevän solun pinnalla. Signaali 2: Kostimulatorinen signalointi esimerkiksi T-solun CD28-molekyylin sitoutuessa CD80/86-molekyyliin. Signaali 3: Sytokiinit ohjaavat T-solujen erilaistumista eri tyyppisiksi vaikuttajasoluiksi. (Curtsinger ym. 1999; Smith-Garvin ym. 2009).

Estrogeenit vaikuttavat ER α -välitteisesti T-solujen, erityisesti CD4⁺ T-solujen aktivaatioon, sytokiinituotantoon, erilaistumiseen ja regulatorisiin toimintoihin (Moulton 2018). ER α :n poistaminen kohdistetusti T-soluista heikentää T-solujen tulehdusta edistäviä ominaisuuksia vähentämällä solujen proliferaatiota ja aktivaatioon liittyvää geeniaktiivisuutta, sekä lisäämällä T-solujen erilaistumisessa keskeisen transkriptiotekijän FOXP3-ekspressiota (Mohammad ym. 2018). Näiden muutosten on havaittu lieventävän tulehdusta haavaista paksusuolentulehdusta eli koliittia jäljittelevässä hiirimallissa (Mohammad ym. 2018). ER α saattaaakin olla sopiva terapeutinen kohde tulehdussairauksissa.

1.2.3 T-solujen erilaistuminen ja sytokiinituotanto

Antigeeniaktivaation jälkeen T-solut jakautuvat ja erilaistuvat eri alatyyppeihin (kuva 6). CD8-positiivisista soluista tulee sytotoksisia T-soluja, jotka tunnistavat MHC I -tyypin molekyylin ja osallistuvat infektoitujen solujen ja syöpäsolujen tuhoamiseen. CD4-positiivisista soluista tulee MHC II -tyypin molekyylin tunnistavia erilaisia auttaja-T-soluja (*engl.* Helper T cell, Th) tai regulatorisia eli säätelijä T-soluja (*engl.* Regulatory t cell, Treg).



Kuva 6. Kaavakuva T-solujen erilaistumisesta eri T-solutyypeiksi antigeeniaktivaation jälkeen. CD8⁺ T-soluista tulee sytotoksisia T-soluja. CD4⁺ T-solut erilaistuvat esimerkiksi auttaja-T-soluiksi (Th1, Th2, Th17) ja regulatorisiksi T-soluiksi (Treg). Alatyypin oikealla puolella on kuvattu joitakin kullekin alatyypille ominaisia sytokiineja. (de Jong ym. 2010; Mosmann ym. 1986; Tan ym. 2016).

CD4⁺ T-solut jaetaan Th1, Th2, Th17 ja Treg-soluihin niiden tuottamien sytokiinien mukaan (kuva 6). Th1-solut tukevat erityisesti soluvälitteistä tulehdusvastetta aktivoimalla muita immuunipuolustuksen soluja ja tuottavat paljon interleukiini 2:ta (IL-2), kasvainnekroositekijä alfaa (TNF α) ja interferoni gammaa (IFN γ) (Mosmann ym. 1986). Th2-solut taas edistävät varsinkin humoraalisen immuunipuolustuksen vasteita. Ne tuottavat etenkin IL-4:ää, IL-5:tä ja IL-13:ta (Mosmann ym. 1986). Th17-solut tuottavat tulehdusta edistävää IL-17:ää (de Jong ym. 2010). Treg-solut ovat välttämättömiä perifeerisen toleranssin toiminnassa ja autoimmuunivasteiden

torjunnassa ja ne tuottavat muun muassa IL-10:tä ja transformoivaa kasvutekijä beetaa (TGF β) (Tan ym. 2016).

Estrogeenien on kuvattu lisäävän tai vähentävän tulehdusvasteeseen vaikuttavien sytokiinien tuottoa T-soluista. Estrogeeni esimerkiksi lisää tulehdusta edistävän IL-17:n ja sen lähetti-RNA:n transkriptiota edistävän tekijän ilmenemistä hiiren pernan valkosoluissa eli splenosyyteissä (Khan ym. 2010). E2 tehostaa myös T-solujen IFN γ :n synteesiä sitoutumalla IFN γ :n promoottoria koodaavan geenin ERE-alueisiin lisäten IFN γ :n lähetti-RNA:n transkriptiota (Fox ym. 1991; Moulton 2018; Priyanka ym. 2013). Vastakkaisia tuloksia on myös raportoitu, kun esimerkiksi ihmisen MS-tautia jäljittelevässä EAE-hiirimallissa estrogeenin on huomattu vaimentavan Th1- ja Th-17-solujen vasteita ja näin välittävän hermostoa suojaavia vaikutuksia (Lélu ym. 2011).

Estrogeenit vaikuttavat T-solujen IL-2:n tuottoon. Esimerkiksi terveillä nuorilla naisilla kuukautiskierron luteaalivaiheessa E2:n määrän ollessa suuri, IL-2:n määrä elimistössä vähenee (Trzonkowski ym. 2001). Synteettinen estrogeeni dietyylitilbestroli puolestaan vähentää hiiren pernan lymfosyyttien proliferaatiota ja IL-2:n tuottoa, mikä herkistää hiiret *Listeria monocytogenes* -bakteerin aiheuttamille tulehduksille (Pung ym. 1985). Etenkin aktivoituneet T-solut tuottavat IL-2:ta, joka toimii autokriinisenä kasvutekijänä ja tehostaa T-solujen aktivaatiota. Hiirten tulehduserkkyys liittyy juuri IL-2:n tuottoon, koska tulehduksesta toipumiseen vaadittavan IL-2 määrä ja samalla myös T-solujen proliferaatio on vähentynyt.

Toisin kuin edellä kuvatuissa tapauksissa, joissa E2 vähentää T-solujen proliferaatiota, E2 lisää ER-välitteisesti rottien pernasta eristettyjen T-solujen proliferaatiota vaikuttamatta kuitenkaan solujen IL-2:n tuottoon (Priyanka ym. 2013). Myös ER α - ja β -agonistit kiihdyttävät kyseisten solujen jakautumista, minkä lisäksi ER β -agonisti lisää myös solujen IL-2:n synteesiä.

1.2.4 Regulatoriset T-solut

Regulatoriset T-solut ovat immunosuppressiivisia eli ne hillitsevät tai estävät muiden tulehdusta edistävien immuunisolujen toimintaa. Luonnollisesti esiintyvät, kateenkorvassa kehittyvät Treg-solut kuvailtiin ensimmäisen kerran 1995 (Sakaguchi ym. 1995). Tutkijat havaitsivat, että hiiret, joiden T-solut olivat CD4-positiivisia ja CD25-negatiivisia kärsivät vakavista autoimmuunireaktioista. Tilanne normalisoitui, kun hiirten verenkiertoon injisoitiin CD4⁺ CD25⁺ T-soluja. IL-2-reseptorin (IL-2R)

alfa-ketju CD25 on yleinen Treg-solujen ilmentämä molekyyli, joka on myös välttämätön näiden solujen toiminnan kannalta (Wing & Sakaguchi 2019). CD25-molekyyliä käytetäänkin usein pintamarkkerina Treg-solujen karakterisoinnissa.

FOXP3 on keskeinen transkriptiotekijä Treg-solujen normaalille kehitykselle ja toiminnalle, ja se on CD25:n ohella yleinen Treg-solujen markkeri. Muut tymosyytit tai T-solut ilmentävät harvoin FOXP3:a edes aktivaation jälkeen. Luonnolliset CD4⁺ FOXP3⁺ Treg-solut ylläpitävät aktiivisesti perifeeristä toleranssia ja vaimentavat mahdollisia autoimmuunireaktioita (Wing & Sakaguchi 2019). Useissa autoimmuunisairauksissa, kuten SLE:ssä (*engl.* Systemic lupus erythematosus) ja kroonisessa tulehduksellisessa suolistosairaudessa, IBD:ssä, (*engl.* Inflammatory bowel disease) FOXP3-positiivisten Treg-solujen määrä tai toiminta on alentunut (Grant ym. 2015), mikä korostaa solutyypin tarpeellisuutta autoimmuunireaktioiden säätelyssä.

Myös estrogeenit vaikuttavat regulatorisiin T-soluihin. Esimerkiksi hiirille, joilta on poistettu munasarjat, annettu estrogeenilisiä kasvattaa CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg-solujen määrää ja lisää FOXP3⁺ T-solujen CD25-ekspressiota (Tai ym. 2008). Samankaltaisia vaikutuksia solupopulaation rakenteeseen ja solujen fenotyyppiin on havaittu myös muilla hiirimalleilla (Polanczyk ym. 2004) ja ihmisen Treg-soluilla (Prieto & Rosenstein 2006).

Vielä ei kunnolla tiedetä, mitä kautta estrogeenien vaikutukset Treg-soluihin välittyvät. Adurthi ym. (2017) ovat osoittaneet, että ihmisen kohdunkaulan syöpäkudoksesta eristettyjen Treg-solujen FOXP3-ekspressio ja supressiiviset vaikutukset lakkaavat, kun E2:n ER α :n kautta tapahtuva signaalointi estetään. He osoittivat, että E2 sitoutuu ER α :an Treg-soluissa ja ER α puolestaan sitoutuu FOXP3:n promoottorissa sijaitsevalle ERE-alueelle. Tulokset viittaavat ER α :n olevan välttämätön FOXP3:n ilmenemiselle ja Treg-solujen normaalille toiminnalle (Adurthi ym. 2017).

1.3 Estrogeenit ja autoimmuunisairaudet

Naisten ja miesten immunologiset vasteet vieraita ja kehon omia antigeenejä vastaan ovat osittain erilaisia. Erot esimerkiksi tulehdusta edistävissä vasteissa ilmenevät ainoastaan hedelmällisessä iässä, mikä viittaa sukupuolihormonien vaikuttavan immuunijärjestelmän toimintaan (Klein & Flanagan 2016). Sukupuolihormonit vaikuttavat luultavasti myös autoimmuunisairauksien syntyyn ja etenemiseen, sillä naiset sairastuvat autoimmuunisairauksiin miehiä useammin. Lisäksi naisilla

autoimmuunisairauksien oireissa tapahtuu yleensä muutoksia kuukautiskierron, raskauden ja vaihdevuosien aikana (Straub 2007). Progesteronia ja androgeenejä pidetään immunosuppressiivisina, kun taas estrogeenien ajatellaan stimuloivan immuunijärjestelmän toimintaa ja näin edistävän autoimmuunisairauksien syntyä. Estrogeenien toiminta ei kuitenkaan ole näin yksinkertaista, sillä ne vaikuttavat eri sairauksien syntyyn ja etenemiseen useilla eri tavoilla.

Estrogeenien on havaittu vaikuttavan autoimmuunisairauksista muun muassa SLE:n, multipeliskleroosin (*engl.* Multiple sclerosis, MS) ja nivelreuman (*engl.* Rheumatoid arthritis, RA) oireisiin. SLE, suomenkieliseltä nimeltään punahukka, on systeeminen autoimmuunisairaus, johon liittyy autovasta-aineiden tuotto. Suurin osa SLE-potilaista kärsii jonkin asteisista nivel- ja iho-ongelmista (Aranow ym. 2019). MS-tauti on T-soluvälitteinen autoimmuunisairaus, jossa autoreaktiiviset T-solut hyökkäävät keskushermoston myeliinikudoksen kimppuun, mikä johtaa aksonien myeliinin häviämiseen ja keskushermostollisten oireiden syntyyn. Yleisin reumaattinen autoimmuunisairaus on nivelreuma, jossa nivelten rakenteissa oleva jatkuva tulehduksellinen tila johtaa kudosten vaurioitumiseen.

Autoimmuunisairauksien oireissa tapahtuu yleensä muutoksia elimistön hormonitoiminnan muuttuessa. Esimerkiksi naisilla SLE:n oireet pahenevat estrogeenien määrän noustessa raskauden, kuukautiskierron ja ehkäisyvalmisteiden käytön aikana (Aranow ym. 2019). Hiirimalleilla tehdyt kokeet ovat vahvistaneet estrogeenin pahentavan SLE:n oireita ja vastaavasti endogeenisen estrogeenin puuttumisen lieventävän oireita (Moulton 2018). Toisin kuin SLE:n tapauksessa, inflammatoristen vasteiden hallitsemisessa MS ja RA autoimmuunisairauksissa, oireet yleensä lievittyvät raskauden edetessä, sillä estrogeenien määrä kehossa nousee tasaisesti raskauden aikana (Figueiredo & Schumacher 2016). Estriolin (Voskuhl ym. 2016) ja synteettisen estrogeenin etinyyliestradiolin (Pozzilli ym. 2015) on todettu suojaavan aaltomaisen MS-taudin oireilta myös raskausajan ulkopuolella.

1.3.1 Estrogeenien T-soluvälitteiset vaikutukset autoimmuunisairauksissa

Autoimmuunisairauksien oireiden muuttuminen raskauden aikana saattaa liittyä estrogeenien kykyyn muokata T-solujen sytokiinituotantoa. Raskauden aikainen kohonnut E2:n määrä lisää esimerkiksi tulehdusta lieventävän IL-10:n eritystä CD4⁺ T-soluista (Gilmore ym. 1997). Myös estronilla (E1) ja raskauden aikana pääasiallisena estrogeeninä toimivalla estriolilla (E3) on sama IL-10:n eritystä tehostava

vaikutus (Correale ym. 1998). E2 lisää myös T-solujen IFN γ :n tuottoa, jolla on puolestaan Th17-soluja inhiboiva vaikutus (Straub 2007). Juuri Th17-solujen ajatellaan olevan vastuussa autoimmuunisairauksissa tapahtuvasta kudosten tuhoutumisesta (Steinman 2007).

Estrogeenien indusoima oireiden paheneminen SLE-potilailla johtuu osittain solujen muuttuneesta interleukiinien tuotosta. SLE-potilaiden CD4⁺ vaikuttaja-T-solut tuottavat tavallista vähemmän IL-2:ta ja enemmän IL-17:ää, mikä johtaa vaikuttaja-T-solupopulaation laajenemiseen (Hedrich ym. 2012). Ilmiön taustalla on CREM-transkriptiotekijä, joka samanaikaisesti vähentää IL-2:n ja lisää IL-17:n tuottoa SLE-potilaiden soluissa (Hedrich ym. 2012). E2 taas lisää kyseisen transkriptiotekijän ilmenemiseen T-soluissa estrogeenireseptorien kautta (Moulton ym. 2012). Niinpä T-solupopulaatioiden säätely SLE:ssä saattaa olla ainakin osittain estrogeenireseptorien kautta tapahtuvan säätelyn alaisena.

Tutkimukset osoittavat, että ER α :n kautta välittyvät estrogeenin vaikutukset ovat pääosin tulehdusta edistäviä, kun taas ER β :n kautta tapahtuvalla signaloinnilla on vähäinen immunosuppressiivinen vaikutus (Li & McMurray 2007). Normaalisti CD4⁺ T-solujen ER α -ekspressio on korkeampi kuin ER β :n ja CD8⁺ T-soluissa kumpaakin estrogeenireseptoria ilmennetään vain vähän. Nivelreumapotilaiden solut ilmentävät kuitenkin enemmän ER β :aa kuin ER α :aa (Capellino ym. 2007; Ishizuka ym. 2004). On mahdollista, että tulehduksen aikaisessa vaiheessa reseptoreita ilmennetään lähes samalla tasolla, mutta kroonisissa tapauksissa ER β :n ilmentäminen nousee suhteellisesti ER α :a korkeammaksi (Straub 2007). Yksi syy muutokselle voi olla ER β :n kautta tapahtuvan immunosuppressiivisen signaloinnin lisääntyminen (Li & McMurray 2007).

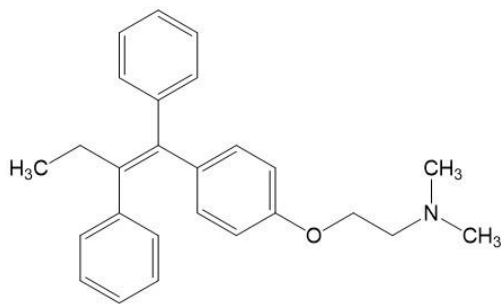
Inui kollegoineen osoittivat, että toisin kuin RA:ssa, SLE:tä sairastavien potilaiden mononukleaariset valkosolut ilmentävät ER α :n lähetti-RNA:ta tavallista enemmän, kun taas ER β :n lähetti-RNA-ekspressio on alentunut (Inui ym. 2007). Myös Riderin tutkimusryhmä on raportoinut korkeammasta ER α :n lähetti-RNA-määrästä ER β :an verrattuna (Rider ym. 2006). He eivät kuitenkaan havainneet eroa ER β :n lähetti-RNA:n määrässä terveisiin henkilöihin verrattuna ja ehdottavatkin reseptorien suhteissa havaittujen muutosten johtuvan vähentyneestä ER α :n ilmentämisestä. Myös proteiinitasolla T-solujen ilmentämien ER-tyyppien määrissä on enemmän vaihtelua sairailta kuin terveillä henkilöillä (Moulton 2018).

1.4 Selektiiviset estrogeenireseptorin modulaattorit

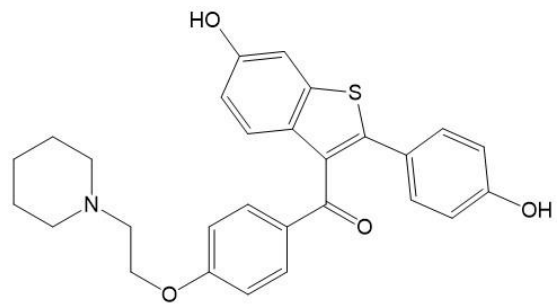
Vaihdevuosien aikaisia ja jälkeisiä oireita sekä useita syöpiä hoidetaan hormonikorvaushoidoilla. Useat sivuvaikutukset kuitenkin rajoittavat hoitojen käyttökelpoisuutta. Esimerkiksi estrogeeni- ja progestiinihoitoihin liittyy kohonnut riski verisuonen tukkeutumiselle verenkierron mukana tulleen hyytymän vuoksi ja lisääntynyt alttius sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin (Rossouw ym. 2002). Tämän lisäksi pelkkään estrogeenihoitoon liittyy suurentunut rintasyöpäriski (Lyytinen & Ylikorkala 2011). Sivuvaikutusten välttämiseksi tavoittelemisen arvoinen vaihtoehto estrogeenihoidoille on kehittää uusia tai hyödyntää jo olemassa olevia kudskohtaisia selektiivisiä estrogeenireseptorin modulaattoreita eli SERMejä (*engl.* Selective estrogen modulator, SERM).

Selektiiviset estrogeenireseptorien modulaattorit ovat estrogeenireseptoreihin sitoutuva yhdisteryhmä (Baker ym. 2000). Estrogeenien vaikutus on aina agonistinen eli niiden sitoutuminen reseptoriin aiheuttaa reseptorin aktivaation. SERMien vaikutus puolestaan vaihtelee kudoksesta riippuen agonistisesta antagonistiseen, jolloin sitoutuminen ei aiheutakaan reseptorin aktivaatiota (Paterni ym. 2014). Yhdisteiden valikoivaa vaikutustapaa selittää ainakin kolme seikkaa; estrogeenireseptoreita ER α ja ER β ilmennetään eri määriä eri kudoksissa, sitoutumisesta johtuvat estrogeenireseptorien konformaatiomuutokset vaihtelevat sitoutuvan SERMin mukaan ja ER-koregulaattoreita ilmennetään ja sidotaan eri kudoksissa eri tavoin (Dutertre & Smith 2000).

Trifenylylietyleneihin kuuluva Tamoksifeeni (ICI 46,474) luokiteltiin 1990-luvulla ei-steroidiseksi antiestrogeeniksi rintasyövän hoitoon (kuva 7) (Jordan 2014). Tamoksifeeni alentaa tehokkaasti rintasyövän aiheuttamaa kuolleisuutta, kunhan hoito aloitetaan syövän aikaisessa vaiheessa (Scottish Cancer Trials Office MRC 1987). Tamoksifeenin vaikutus on rintakudoksessa antiestrogeeninen, mutta vaikutukset luuhun, endometriumiin eli kohdun limakalvoon ja verenkierron kolesterolitasojen säätelyyn ovat kuin estrogeenilla (Jordan 2001; Lerner & Jordan 1990). Edellä kuvattujen tutkimustulosten pohjalta kehittyi ajatus selektiivisistä estrogeenireseptorin modulaattoreista.



Tamoksifeeni



Raloksifeeni

Kuva 7. Selektiivisten estrogeenireseptorien modulaattoreiden Tamoksifeenin ja Raloksifeenin kemialliset rakenteet. (Muokattu kohteesta Norman & Henry 2015).

Raloksifeeni on bentsotiofeenien ryhmään kuuluva toisen sukupolven SERM-yhdiste (kuva 7). Sillä on antiestrogeeninen vaikutus rinnan ja kohdun kudokseen ja estrogeeninen vaikutus luuhun, rasva-aineenvaihduntaan ja veren hyytymiseen. Yhdysvaltain lääkeviranomaisen FDA hyväksyi raloksifeenin 1997 postmenopausaalisen osteoporoosin estoon ja hoitoon, sekä alentamaan rintasyövän riskiä riskiryhmään kuuluvilla menopaussin ohittaneilla naisilla (Scott ym. 1999). Toisin kuin tamoksifeeni, joka lisää kohdun limakalvon paksuuntumista, raloksifeeni ei välitä estrogeeninkaltaisia vaikutuksia kohdun kudoksissa (Goldstein 2006). Raloksifeenin haittavaikutuksia ovat kuitenkin laskimotromboemboliat ja vasomotoriset oireet, kuten kuumat aallot (Maximov ym. 2013).

1.4.1 SERM:t ja T-solut

SERMien vaikutuksia immuunijärjestelmään ei vielä kunnolla tunneta, mutta joillakin SERMeillä on osoitettu olevan immuunipuolustusta muokkaavia vaikutuksia. De Kozak ym. (2004) tutkivat tamoksifeenin vaikutuksia rotilla, joille oli aiheutettu T-soluvälitteinen autoimmuunitauti EAU (*engl.* Experimental autoimmune uveoretinitis). EAU:lla pyritään jäljittelemään ihmisten tulehduksellisia silmäsairauksia (Caspi 2003). Nanopartikkeleihin yhdistetty tamoksifeeni hidasti silmän sisäisinä pistoksina EAU:n etenemistä ja ohjasi immuunivasteita Th1-välitteisestä tulehdusta hillitsevään Th2-suuntaan (de Kozak ym. 2004).

Tamoksifeenilla on todettu olevan tulehdusta hillitseviä ja T-solujen fenotyypin vaikuttavia ominaisuuksia SLE:tä mallintavilla MRL lpr -hiirillä (Apelgren ym. 1996). MRL lpr -hiirillä on glomerulonefriitti eli munuaiskeräsen tulehdus, minkä lisäksi hiirille kehittyy epänormaalin suuri CD4 ja CD8 tuplanegatiivinen T-solupopulaatio. Tautimallin CD4/CD8 tuplanegatiiviset yksilöt reagoivat heikosti antigeeneihin ja

niiden IL-2-välitteiset vasteet ovat epätäydellisiä (Altman ym. 1981). Tamoksifeenin on osoitettu hillitsevän glomerulonefriitin oireita MRL lpr -naarashiirillä ja parantavan hiirten selviytymistä (Apelgren ym. 1996). Tamoksifeeni myös vähentää CD4 ja CD8 tuplanegatiivisten T-solujen määrää *in vivo* ja rajoittaa IL-2-riippuvaista tuplanegatiivisten T-solujen proliferaatiota *in vitro* (Wu ym. 2000).

Bebo ym. (2009) osoittivat ihmisen MS-tautia jäljittelevällä EAE-hiirimallilla, että tamoksifeeni ja raloksifeeni ehkäisevät myeliinin antigeenejä spesifisesti tunnistavien T-solujen proliferaatiota. Heidän tutkimuksensa perusteella etenkin tamoksifeenin kaltaisia SERMejä voisi hyödyntää keskushermostoon vaikuttavien inflammatoristen autoimmuunisairauksien hoidossa (Bebo ym. 2009).

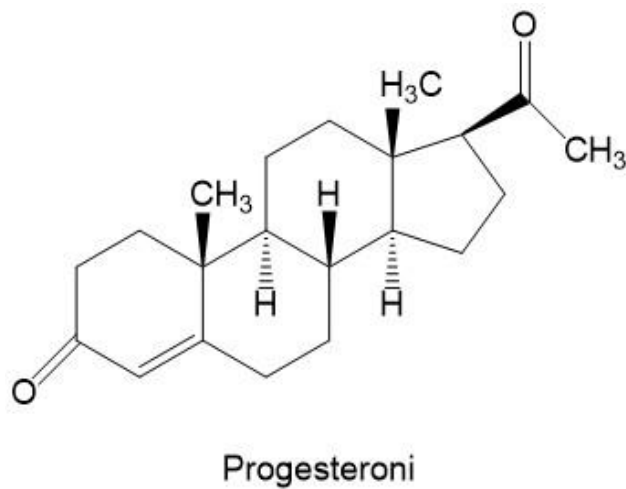
Raloksifeenin sekä sen analogin LY117018 vaikutukset kateenkorvaan ovat vähäisiä, eivätkä ne vaikuta kateenkorvan T-solupopulaatioon (Bernardi ym. 2015; Erlandsson ym. 2000). E2 taas vähentää tymosyyttien osuutta kateenkorvan solupopulaatiossa, mutta lisää kypsempien T-solujen osuutta, minkä lisäksi se vähentää kateenkorvan painoa (Bernardi ym. 2015). Näin ollen raloksifeenin vaikutukset T-soluihin poikkeavat estrogeenin vaikutuksista.

T-solujen lisäksi myös muut immuunipuolustuksen solut saattavat reagoida E2:een ja SERMeihin ja välittää estrogeenien vaikutuksia edelleen T-soluihin esimerkiksi sytokiinituotannon kautta. T-solujen lisäksi estrogeenireseptoreita ilmentävät esimerkiksi B-solut ja dendriittisolut (Kovats 2015). Näistä dendriittisolut ovat naiiveja T-soluja pääasiassa aktivoiva solutyyppejä (Watts ym. 2010) ja B-solujen on osoitettu olevan välttämättömiä T-solujen immunologisen muistin ylläpidossa (Whitmire ym. 2009). Solukokeissa on havaittu, että tietyt uudet SERMit kuten SERM2 ja SERM7 sekä raloksifeeni, vaikuttavat immuunijärjestelmän toimintaan ohjaamalla makrofageja erilaistumaan anti-inflammatoriseen M2-suuntaan (Polari ym. 2018). M2-suuntaan polarisoituneet makrofagit edistävät tulehdusta hillitsevien Th2-solujen vasteita (Martinez & Gordon 2014).

1.5 Progesteroni

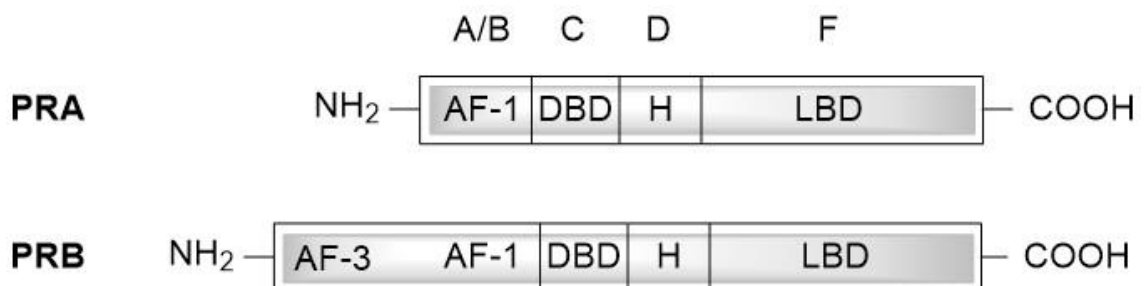
Progesteroni eli keltarauhashormoni on munasarjojen keltarauhasessa ja raskauden aikana istukassa tuotettu steroidihormoni (kuva 8). Progesteronireseptorien kautta tapahtuva signaali vaikuttaa etenkin kohdun limakalvon erilaistumiseen ja maitorauhasen epiteelin toimintaan. Lisäksi sillä säädellään gonadotropiineja

vapauttavan hormonin eritystä ja hedelmöittyneen munasolun kiinnittymistä kohdun limakalvoon. Progesteronin biologisen vaikutuksen ilmeneminen on kuitenkin riippuvainen myös kudosten estrogeenisestä stimulaatiosta.



Kuva 8. Progesteronin eli keltarauhashormonin kemiallinen rakenne. (Muokattu kohteesta Norman & Henry 2015).

Progesteronin genomiset vaikutukset välittyvät pääasiassa tumareseptoreihin kuuluvien progesteronireseptorien (PR) kautta. Progesteronireseptoria koodaavasta geenistä (*PGR*) tuotetaan vaihtoehdoisen silmukoinnin ja eri promoottorien avulla useita eri isoformeja. Näistä PRA ja PRB isoformit ovat hyvin karakterisoitu (kuva 9). Molempia isoformeja koodaa sama geeni, mutta niiden transkriptio tapahtuu eri promoottorialueilta (Clarke & Graham 2012). PRA ja PRB eroavat rakenteellisesti toisistaan ainoastaan N-terminaalisen pään pituuden suhteen. PRA isoformi on 164 aminohappoa lyhyempi kuin PRB (Bain ym. 2007).



Kuva 9. Tumareseptoreihin kuuluvien progesteronireseptorien PRA ja PRB rakenne. Ylimpänä on esitetty tumareseptorien yleinen nimeämiskäytäntö rakenteisiin A – F. PRA:n ja PRB:n rakennekuvissa on merkitty progesteronireseptoreille ominaiset rakenteet. PRB:n A/B alueella sijaitsee kaksi transaktivaatioaluetta (AF-3/1), kun lyhyemmällä PRA:lla on vain yksi transaktivaatioalue (AF-1). Loput rakenteet ovat DNA:ta sitova alue (DBD), sarana-alue (H) ja ligandia sitova alue (LDB). (Muokattu kohteesta Bain ym. 2007).

Kolmas progesteronireseptori PRC löydettiin alun perin rintasyöpäsoluilla tehdyissä tutkimuksissa (Wei ym. 1990). PRA:sta ja PRB:stä poiketen PRC ei sitoudu DNA:han. PRC voi kuitenkin vapaita ligandeja sitomalla antagonisoida PRA:n ja PRB:n toimintaa (Garg ym. 2017). On ehdotettu, että inhibitorisen PRC:n toiminta liittyy synnytykseen, jolloin PRA:n ja PRB:n kohdun supistelua vaimentavia vaikutuksia ei enää tarvita (Condon ym. 2006)

Kun progesteronireseptoreissa A ja B ei ole ligandia sitoutuneena, ne ovat solun sytoplasmassa ja tumassa kaperoniproteiineihin (*engl.* Chaperons) sitoutuneina (Garg ym. 2017). Ligandin sitoutuminen käynnistää niin kutsutun klassisen signalointireitin ja saa PR:t irtoamaan kaperoneistaan ja lokalisoitumaan tumaan, missä ne aktivoivat kohdegeeniensä transkriptiota. Tumassa PR:t rekrytoivat myös useita transkriptiotekijöitä, jotka joko edistävät tai vähentävät transkriptiota (Garg ym. 2017).

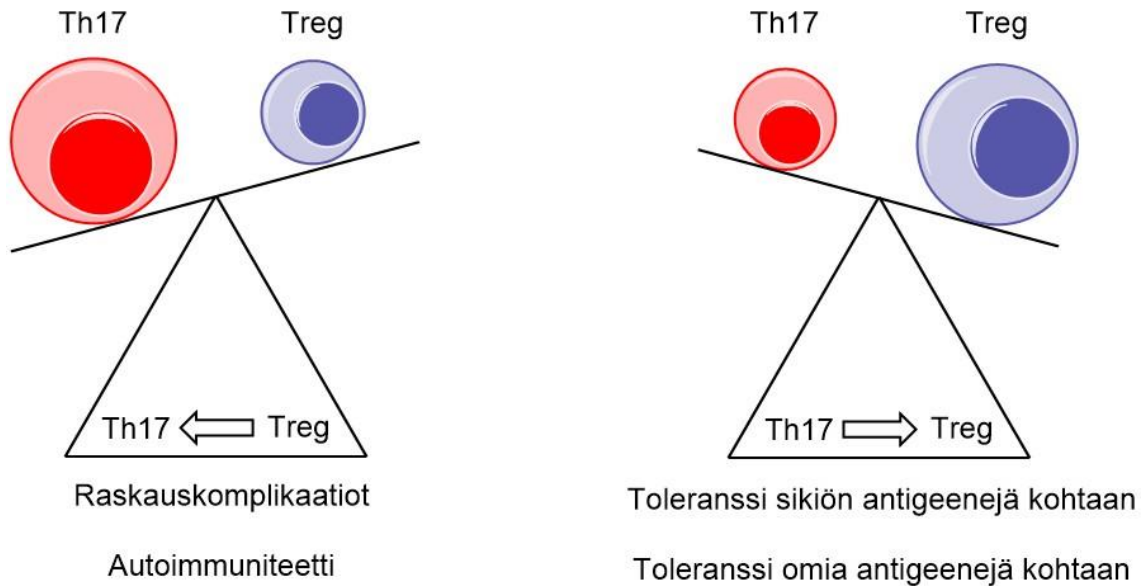
Progesteronin ei-genomiset vaikutukset välittyvät soluissa solukalvoille assosioituneiden eli membraanisten progesteronireseptorien (mPR) kautta. Membraanisia progesteronireseptoreita tunnetaan tällä hetkellä ainakin viisi (mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ , mPR ϵ) (Garg ym. 2017). Signaali mPR:ien kautta vaikuttaa kehittyvien munasolujen eli oosyyttien kypsymiseen, rintasyöpäsolujen kasvuun ja tulehdusta edistävien sytokiinien tuottoon (Garg ym. 2017).

1.5.1 Progesteroni ja immuunijärjestelmä

Progesteronin vaikutukset immuunijärjestelmään ovat pääsääntöisesti supressiivisia (Moulton 2018). Progesteronin toiminta korostuu etenkin raskauden aikana, jolloin progesteronin määrä nousee erityisen korkeaksi. Raskauden aikana immuunivasteet ovat pääasiassa Th2-tyyppisiä Th1-vasteiden ollessa alentuneita (Piccinni ym. 1998). Progesteroni tukee Th2-tyyppisten vasteiden syntyä lisäämällä IL-4:n tuottoa ja toisaalta heikentämällä IFN γ :n tuottoa ja Th17-solujen vasteita (Tan ym. 2015).

Raskaus asettaa suuren haasteen äidin immuunipuolustukselle ja erityisesti Treg- ja Th17-solut vaikuttavat raskauden kulkuun. Etenkin Treg-solujen merkityksellisyydestä raskauden aikana on kirjoitettu kattavia katsausartikkeleita (Schumacher & Zenclussens 2014; Teles ym. 2013). Treg-soluja välttämättömämpi tekijä on Treg- ja Th17-solujen välinen tasapaino, joka ylläpitää äidin immunologista toleranssia sikiötä kohtaan (kuva 10) (Figueiredo & Schumacher 2016). Toleranssin säätelyyn vaikuttaa luultavasti myös progesteroni. Sen on esimerkiksi todettu ohjaavan napaverestä eristettyjä naiiveja T-soluja Treg-suuntaan (Lee ym. 2012). Progesteroni säätelee luultavasti suoraan myös

Treg-soluja, sillä osa raskauden aikana laajenevan Treg-solupopulaation soluista alkaa ilmentää membraanista PR α :aa (Areia ym. 2015). Progesteroni voi vaikuttaa myös Treg- ja Th17-solujen väliseen tasapainoon säätelällä tulehdusta edistävien Th17-solujen osuutta, sillä progesteronin tiedetään vähentävän ainakin sikiön T-solujen erilaistumista Th17-soluiksi (Lee ym. 2012).



Kuva 10. Treg- ja Th17-solujen välinen tasapainotila. Erilaisissa autoimmuunitiloissa Treg- ja Th17-solujen välinen tasapaino on usein häiriintynyt niin, että patogeenisia Th17-soluja on liikaa ja Treg-solupopulaation ollessa pienentynyt, minkä lisäksi Treg-solujen toiminta voi olla puutteellista. Vastaava tilanne havaitaan usein raskauskomplikaatioiden, kuten ennenaikaisen synnytyksen ja raskausmyrkytyksen (pre-eklampsia) yhteydessä. Treg/Th17 -tasapainon ollessa Treg-painotteinen immunologinen toleranssi yleensä säilyy sekä omia että sikiön antigeenejä kohtaan. (Muokattu kohteesta Figueredo & Schumacher 2016).

1.6 Työn tarkoitus

Tutkimus tehtiin dosentti Jorma Määttä tutkimusryhmässä Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia estrogeeni- ja progesteronireseptorien ligandien indusoimia vasteita T-soluissa. Ryhmän aikaisemmat tulokset ovat osoittaneet, että uusi SERM-yhdiste SERM2 indusoi myeloidisten solujen fenotyypimuutosta anti-inflammatoriseen suuntaan ja aktivoi anti-inflammatoristen sytokiinien erityksen soluista (Polari ym. 2018). Tämän lisäksi SERM2 ja raloksifeeni inhiboivat primaaristen T-solujen proliferaatiota.

Tässä pro gradu -työssä haluttiin selvittää, millaisia hormonireseptorien kautta tapahtuvia vaikutuksia SERM:t aiheuttavat T-soluissa. Tutkimukselta odotettiin uutta tietoa etenkin uuden SERM2:n vaikutuksista. T-solujen ER- ja PR-ligandien

vaikutusten tutkiminen voi lisätä ymmärrystä siitä, miten hormonit vaikuttavat tulehdusvasteiden säätelyyn. Tutkimuksen tarkoituksena oli myös saada lisätietoa siitä, minkä tyyppisiin T-soluihin hormonien vaikutukset kohdistuvat. Lisäksi estogeenisten yhdisteiden ja niiden reseptorien vuorovaikutusten ymmärtäminen voi edesauttaa T-soluihin kohdennettujen immunoterapioiden kehityksessä, mitä voitaisiin hyödyntää etenkin tulehduksellisten sairauksien hoidossa.

Spesifiset tutkimuskysymykset olivat:

1. vaikuttavatko SERMit Jurkat-solujen elinkelpoisuuteen?
2. vaikuttavatko SERMit Jurkat-solujen fenotyyppiin?

Lisäksi haluttiin tietää, onko SERMeillä immunomodulatorisia vaikutuksia Jurkat-soluihin.

2 Aineisto ja menetelmät

2.1 Käytetty solulinja ja kasvuolosuhteet

Tutkimuksessa tarkasteltiin selektiivisten estrogeenireseptorin modulaattorien vaikutusta T-solujen aktiivisuuteen ja toimintaan Jurkat T-soluilla. Jurkat-solulinja on akuutin lymfooman soluista eristetty ja immortalisoitu suspensiossa kasvava syöpäsolulinja. Morfologialtaan Jurkat-solut ovat lymfoblasteja.

Soluja kasvatettiin värittömässä RPMI-1640 kasvatusmediumissa, johon lisättiin 10 % EU-hyväksytty lämpöinaktivoitu naudan sikiön seerumi (*engl.* Heat-inactivated fetal bovine serum, iFBS), 10 mM HEPES, 1 mM natriumpyruvaatti, 2 mM L-glutamiini ja 50 U/ml Penisilliini ja 50 mg/l Streptomysiini. Kaikki kasvatusmediumin reagenssit on hankittu Thermo Fisher Scientific Lifestyle Technologies:lta.

Solukasvatus aloitettiin nestetyypeen säilytyistä Jurkat-soluista (Professori Jorma Ilosen lahjoittamat solut). Solut sulatettiin nopeasti ja siirrettiin falcon-putkeen, johon lisättiin lämmintä mediumia. Putki sentrifugoitiin (200 x g, 5 min) ja supernatantti poistettiin, minkä jälkeen solut resuspensoitiin mediumiin ja siirrettiin kasvatuspulloon. Solukasvatuksia ylläpidettiin inkubaattorissa (37 °C, 5 % CO₂). Solut jaettiin 4 – 5 päivän välein uusiin kasvatuspulloihin niin, että solutiheys oli 1 x 10⁵ – 1 x 10⁶ solua / ml. Soluja säilöttiin myös nestetyypeen. Säilytystä varten kryoputkiin pipetoitiin 1 x 10⁶ solua pakasteliuoksessa (90 % FBS ja 10 % DMSO). Kryoputket laitettiin vuorokaudeksi -80 °C, mistä ne siirrettiin nestetyypeen.

Tutkimuksessa Jurkat-solut aktivoitiin kemiallisilla yhdisteillä, jotka stimuloivat soluja jakaantumaa epäspesifisesti niiden antigeenispesifisyydestä riippumatta. Solujen altistus tutkittaville SERMeille ja E2:lle tehtiin ennen mitogeneeniaktivaatiota, sillä tutkimuksen tarkoituksena on pyrkiä vaikuttamaan lepääviin tai naiiveihin solupopulaatioihin. SERMit eivät toimi tulehduslääkkeiden tavoin eli ne eivät vaikuta jo aktivoituneiden solujen toimintaan.

2.2 Virtaussytometria

Virtaussytometria on solujen pintaproteiinien ja solunsisäisten molekyylien analysointiin käytetty menetelmä. Sitä voidaan käyttää myös solupopulaatioiden erotteluun, solujen koon ja kokonaismäärän analysointiin. Solut analysoidaan valon sironnan ja merkkiaineiden fluoresenssin perusteella. Valon sirontaa soluista mitataan

kahdesta eri suunnasta suhteessa laservalon kulkusuuntaan; pienen kulman sironta (*engl.* Forward scatter, FCS) kuvaa solun kokoa ja sivusironta (*engl.* Side scatter, SSC) kuvaa solun granulaarisuutta. Soluja analysoidaan myös spesifisesti sitoutuvien vasta-aineiden avulla, joihin on vuorostaan sidottu fluoresoivia merkkiaineita eli fluorokromeja. Tarkasteltavien kohteiden erottelu tapahtuu virittyneiden fluorokromien emittoimien fluoresenssien intensiteettien mukaan.

2.2.1 Jurkat-solujen proteiiniekspression tutkiminen

Jurkat-solujen karakterisoimiseksi solut värjättiin CD3 ja CD4 pintaproteiineihin sitoutuvilla vasta-aineilla valmistajan ohjeen mukaan (0,5 µl/värjäys, BD Biosciences). CD3-kompleksi on yleisesti käytetty T-solumarkkeri (Chetty & Gatter 1994). Solujen identiteetin varmistamiseksi ne värjättiin myös CD4-proteiiniin sitoutuvalla vasta-aineella, sillä tiedetään, että kaupallisen Jurkat E6-1-linjan solut ilmentävät pinnallaan pieniä määriä CD4-pintaproteiinia, mutta eivät lainkaan CD8 proteiinia (Chetty & Gatter 1994).

Virtaussytometrialla selvitettiin myös, vaikuttavatko SERMit Jurkat-solujen fenotyypissä tapahtuviin muutoksiin. Solut värjättiin CD4, CD3, CD25, CD127, FOXP3 proteiineja tunnistavilla vasta-aineilla (taulukko 1). Näiden proteiinien määrissä tapahtuvat suhteelliset muutokset kertovat solujen erilaistumisasteesta.

Jurkat-soluja kasvatettiin 96-kuoppalevyllä (lähtötiheys 2×10^4 solua/kaivo/200 µl). Jurkat-solut altistettiin 48 h tamoksifeenille (Sigma Aldrich), raloksifeenille (Sigma Aldrich) ja SERM2:lle (Forendo Pharma) (kaikkien pitoisuus 1 µM). Osa liuoksista sisälsi soluille haitallista dimetyylisulfoksidia (*engl.* Dimethyl sulfoxide, DMSO), joten osa kontrollisoluista altistettiin pelkästään DMSO:lle. Kahden vuorokauden kuluttua SERM- ja E2-altistuksesta solut aktivoitiin fytohemagglutiniinilla (PHA) (10 µg/ml) 24 h. PHA:n pitoisuus valittiin aikaisemman tutkimuksen perusteella (Wiklund, 2018). Aktivaation jälkeen solut sentrifugoitiin (200 x g, 5 min), supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin steriilisuodatettuun PBS/0,5 % FBS-luokseen (300 µl / näyte). Solut siirrettiin 96-kuoppalevyille (150 µl/kuoppa) ja levy sentrifugoitiin (200 x g, 5 min). Supernatantti poistettiin ja soluille pipetoitiin Human BD Fc Block -blokkauksiliuos (BD Biosciences) (100 µl / kaivo). Human BD Fc Block oli laimennettu suodatettuun PBS:ään 1:100. Fc Block reagenssi sitoutuu immuunisoluissa yleisesti esiintyviin Fc-reseptoreihin, mikä estää värjäykseen käytettävien vasta-aineiden epäspesifisen sitoutumisen. Soluja inkuboitiin Fc Block -reagenssin kanssa 15 minuuttia. Tämän

jälkeen levy sentrifugoitii kuten edellä, supernatantti poistettiin ja solut värjättiin taulukossa 1 kuvatuilla vasta-aineilla (0,5 µl / kaivo). Pinta- ja solunsisäisten proteiinien vasta-ainevärjäys suoritettiin BioLegend®-kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti (liite 1). Sitoutuneiden vasta-aineiden määrä analysoitiin BD LSRFortessa –virtaussytometrillä (BD Biosciences) ja BD FACSDiva 8 –ohjelmalla (BD Biosciences). Tulosten analysointi tehtiin Flowing Software 2.5.1 –ohjelmalla (<http://flowingsoftware.btk.fi>).

Tulosten tilastollinen analyysi tehtiin GraphPad Prism 8.1.2 (GraphPad Software) ohjelmalla. Tulosten normaalijakautuneisuus testattiin Shapiro-Wilkin testillä. Normaalisti jakautuneiden ryhmien keskiarvojen välisiä eroja tarkasteltiin yksisuuntaisella ANOVA-analyysillä. ANOVAn oletus populaatioiden samoista keskihajonnoista testattiin Brown-Forsythen testillä. Parivertailuun (post hoc -testaus) käytettiin Tukeyn testiä. CD3⁺CD4⁺ solupopulaation mittauspisteet eivät noudattaneet normaalijakaumaa, joten tämän populaation tilastollinen testaus tehtiin Kruskal-Wallisin epäparametrisellä testillä, minkä jälkeen parivertailu suoritettiin Dunnin testillä. Ilmoitetut P-arvot ovat korjattuja (*engl.* Adjusted) P-arvoja, ja merkitsevyytasoksi on valittu P-arvo < 0,05.

Taulukko 1 Virtaussytometriassa käytetyt konjugoidut vasta-aineet ja niiden tuotenumerot.

Markkeri	Konjugoitu vasta-aine	Tuotenumero
CD3	BV421 mouse anti-human CD3 (BD Biosciences)	562427
CD4	Alexa Fluor 700 mouse anti-human CD4 (BD Biosciences)	566318
CD25	PE anti-human CD25 (BioLegend)	302605
CD127	Brilliant Violet 605™ anti-human CD127 (IL-7Ra) (BioLegend)	351333
FOXP3	Alexa Fluor 488 anti-human FOXP3 (BioLegend)	320211

2.3 Solujen elinkelpoisuuden mittaus

Solujen viabiliteetin eli elinkelpoisuuden mittaamiseen käytettiin AlamarBlue™ reagenssia (Invitrogen). AlamarBlue™ reagenssin aktiivinen ainesosa on soluille harmiton autofluoresoimaton natriumsuola resatsuriini, joka toimii mitokondrioiden elektroninsiirtoketjussa elektroninvastaanottajana häiritsemättä kuitenkaan

elektroninsiirtoketjun normaalia toimintaa (Rampersad 2012). Elävät solut hapettavat resatsuriinin punaiseksi resorufiiniksi, mikä on voimakkaasti fluoresoiva yhdiste. Elinkelpoiset solut muuttavat jatkuvasti resatsuriinia resorufiiniksi, jolloin fluoresoivan aineen pitoisuus kasvaa ja elinkelpoisten solujen määrä voidaan selvittää mittaamalla fluoresenssin intensiteetti 580 nm aallonpituudella.

Jurkat-soluja kasvatettiin 96-kuoppalevyllä (lähtötiheys 2×10^4 solua/kaivo/200 μ l). Solut altistettiin raloksifeenille (1 μ M tai 3 μ M), SERM2:lle (1 μ M tai 3 μ M) tai E2:lle (10 nM) 48 h ajan. Solut aktivoitiin 24 h PHA:lla (1 μ g/ml) ja forboli 12-myristaatti 13-asetaatilla (PMA) (50 ng/ml). Tupla-aktivaatiossa käytetyt pitoisuudet ovat valmistajan suositus (Sigma-Aldrich). Kokeeseen sisällytettiin myös kontrollisolut, joita ei altistettu estrogeenisille yhdisteille, mutta jotka aktivoitiin PHA:lla ja PHA:lla kuten edellä. Vuorokauden kuluttua aktivaatiosta soluille pipetoitiin alamarBlue™ reagenssi (20 μ l/kaivo), ja soluja inkuboitiin lämpökaapissa kaksi tuntia. Fluoresenssi mitattiin Hidex Plate Chameleon –levylukijalla (Hidex Oy) 580 nm aallonpituudella MicroWin 2000 –ohjelmalla (Mikrotek Laborsysteme GmbH). Kunkin ryhmän fluoresenssin intensiteetit suhteutettiin käsittelemättömien kontrollisolujen fluoresenssin intensiteettien perustasoon. Tulosten tilastollinen analysointi tehtiin ANOVAlla, minkä jälkeen parivertailut suoritettiin Tukeyn testillä.

2.4 Kvantitatiivinen polymeraasireaktio

Polymeraasiketjureaktio (*engl.* Polymerase chain reaction, PCR) on kolmesta vaiheesta koostuva menetelmä halutun DNA-sekvenssin monistamiseen. Ensimmäinen vaihe on denaturaatio, jossa tutkittava seos kuumennetaan yli 90 °C, mikä saa emästen väliset vetysidokset katkeamaan ja DNA:n vastinjuosteet irtoamaan toisistaan. Seuraavaksi lämpötilaa lasketaan 50 – 60 °C, jolloin alukkeet sitoutuvat komplementaarisesti DNA-sekvenssiin. Tätä seuraa pidentymisvaihe, missä lämpötila nostetaan noin 70°C ja korkea lämpötilaa kestävä DNA-polymeraasientsyymi sitoutuu alukkeiden 3'-päähän ja luo uudet juosteet yksijuosteisen DNA-templaatin mukaisesti. Näitä kolmea vaihetta toistetaan, ja joka kierroksella monistuu lisää DNA-tuotetta, jonka lopullinen määrä on suoraan verrannollinen DNA:n alkuperäiseen määrään.

Perinteisessä PCR-menetelmässä monistetut DNA-tuotteet eli amplikonit havainnoidaan menetelmän lopuksi, mutta reaaliaikaisessa qPCR-menetelmässä (*engl.* Quantitative polymerase chain reaction) monistumista mitataan PCR-reaktion aikana jokaisen syklin

jälkeen. Havainnointiin voidaan käyttää epäspesifisiä DNA:han sitoutuvia koettimia tai spesifisesti tiettyyn sekvenssiin sitoutuvia fluoresoivia koettimia.

Tutkimuksessa tarkasteltiin SERMeille altistettujen ja aktivoitujen Jurkat-solujen lähetti-RNA:n määriä. Tarkoituksena oli tutkia vaikuttavatko SERMit tiettyjen geenien ilmenemiseen. Tutkitut geenit on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2 Tutkimukseen valitut geenit, joiden lähetti-RNA kvantitoitiin Jurkat-soluista qPCR-menetelmällä.

Interleukiinit	<i>IL1B, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL17A</i>
Sytokiinit ja kemokiinit	<i>TGFBI, TNF, CCL5, IFNG</i>
Hormonireseptorit	<i>ESR1, ESR2, GPER1, PGR</i>
Transkriptiotekijät	<i>FOXP3</i>

2.4.1 RNA:n eristys

RNA:n eristystä varten Jurkat-soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyllä 48 h SERM2:n (1 µM), raloksifeenin (1 µM) tai E2:n (10 nM) kanssa. Tämän jälkeen solut aktivoitiin 24 h PHA:lla (10 µg/ml) tai PHA:lla (1 µg/ml) ja PMA:lla (50 ng/ml), minkä jälkeen solut hajotettiin eli lyysattiin ja RNA eristettiin NucleoSpin[®]-kitillä (Macherey-Nagel). Suspensiossa olevat solut kerättiin eppendorf-putkiin, solut pelletoitettiin (200 x g, 5 min), supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin NucleoSpin[®]-kitin RA1-puskuriin (Macherei-Nagel) ja 1 % 2-merkaptetanoliin (Sigma-Aldrich). RNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop[™] One -spektrofotometrillä (ThermoFisher Scientific).

2.4.2 cDNA-synteesi ja qPCR-ajot

Jurkat-soluista eristetyn RNA:n (1500 ng/reaktio) kääntämiseen cDNA:ksi käytettiin High-Capacity cDNA Reverse Transcription -kittiä (AppliedBiosystems[™], ThermoFisher Scientific). Reaktioseokset tehtiin valmistajan ohjeen mukaan (liite 2). Käänteistranskriptaasiketjureaktio tehtiin Eppendorf 5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler -laitteella (Eppendorf AG) cDNA-kitin ohjeessa esitetyn ohjelman mukaan (liite 2).

qPCR-määrittäminen tehtiin TaqMan[®]-menetelmällä valmistajan ohjeen mukaan (AppliedBiosystems[™], ThermoFisher Scientific). Reaktioliuoksen valmistusohje ja

käytettyjen alukkeiden tiedot ovat liitteissä 3 ja 4. Tulosten analysoinnissa referenssigeeneinä käytettiin 18S ribosomaalista RNA:ta ja GAPDH:ta, koska näiden ilmentäminen ei muutu PHA- tai PMA-aktivoituissa Jurkat-soluissa (Banda ym. 2008; Ledderose ym. 2011). Tutkittujen geenien mitatuista Ct-arvoista vähennettiin ensin referenssigeenien Ct-arvo, minkä jälkeen tulokset suhteutettiin kunkin geenin käsittelemättömien kontrollinäytteiden geeniekspressioon.

Ennen tilastollista testausta tehtiin logaritminmuunnos aineistolle, joka ei Shapiro-Wilkin testin mukaan noudattanut normaalijakaumaa (IL-2 ja IL-10). Tämän jälkeen tilastollinen testaus tehtiin ANOVAlla ja parivertailut Dunnettin testillä.

2.5 Interleukiini 2:n kvantitointi ELISA-menetelmällä

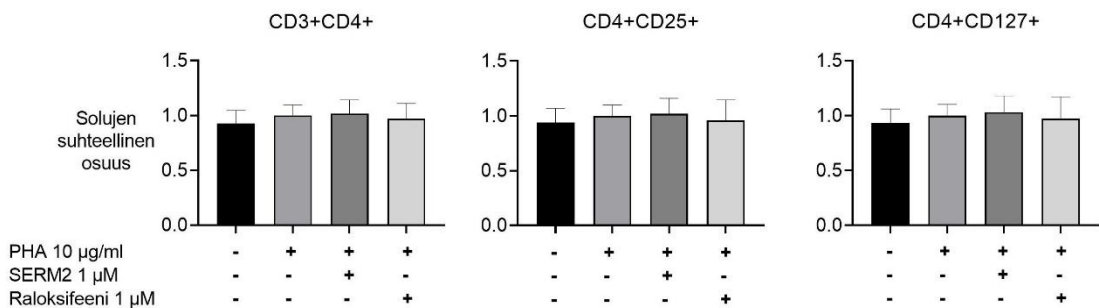
SERMien ja E2:n vaikutuksia aktivoitujen solujen interleukiini 2:n tuottoon tarkasteltiin ELISA-menetelmällä. Jurkat-soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyllä 48 h SERM2:n (1 μ M), raloksifeenin (1mM) tai E2:n (10 μ M) kanssa. Solut aktivoitiin 24 h PHA:lla (10 μ g/ml) tai PHA:lla (1 μ g/ml) ja PMA:lla (50 ng/ml), minkä jälkeen solujen supernatantti kerättiin talteen mittausta varten.

ELISA-mittaus tehtiin IL-2 Human ELISA kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti (Invitrogen). Absorbanssit mitattiin Victor² 1420-012 levylukijalla (Wallac) ja standardinäytteiden absorbanssien perusteella tehtiin GraphPad Prism 8.1.2 ohjelmalla (GraphPad Software) standardisuora, jota käytettiin tutkittavien näytteiden IL-2-pitoisuuksien määrittämiseen. Aineiston tilastolliseen testaus tehtiin epäparametrisella Kruskal-Wallis testillä.

3 Tulokset

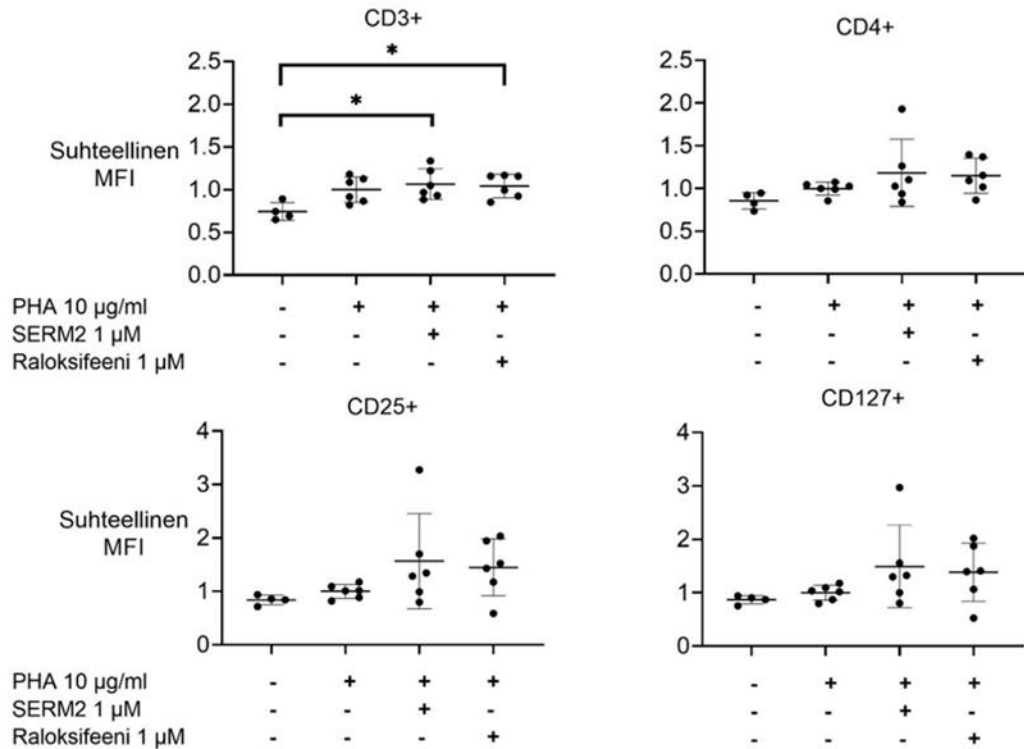
3.1 SERMit eivät muuta Jurkat-solujen fenotyyppejä

Jurkat-solujen karakterisointi tehtiin immunovärjäyksellä ja virtaussytometrillä. Lisäksi selvitettiin SERMien vaikutuksia Jurkat-solujen fenotyyppeihin eli erilaistumislinjaan. Jurkat-solut aktivoitiin PHA:lla, minkä jälkeen ne värjättiin CD3ε, CD4, CD25 ja CD127 pintaproteiinit tunnustavilla vasta-aineilla. Jurkat-solut olivat odotetusti CD3ε, CD4, CD25 ja CD127 -positiivisia, mutta SERM-käsittelyllä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta analysoidujen markkeriproteiinien suhteelliseen ilmentymiseen populaatiotasolla eli pintaproteiineja ilmentävien solujen prosentiosuuksissa ei tapahtunut muutoksia (kuva 11).



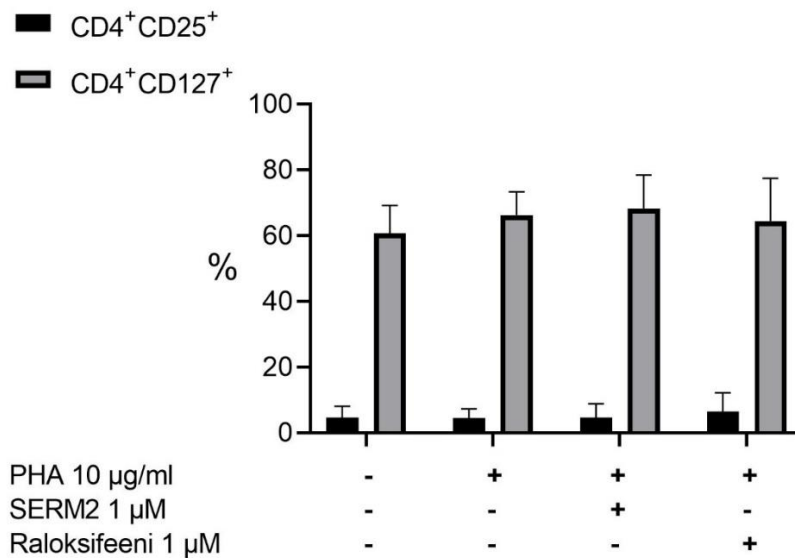
Kuva 11. PHA:n ja SERMien vaikutukset CD3⁺CD4⁺-, CD4⁺CD25⁺- ja CD4⁺CD127⁺ -positiivisten solujen osuuksiin koko Jurkat-solupopulaatiosta. Jurkat-solut altistettiin 48 h SERMeille (1 µM) ja aktivoitiin 24 h PHA:lla (10 µg/ml). Kaikki ryhmät on suhteutettu aktivaation perustasoon. Kuvaajissa on esitetty ryhmien keskiarvot ±SD.

Koska markkeriproteiinien määrissä ei havaittu eroja solupopulaatiotasolla, tarkasteltiin seuraavaksi käsittelyiden aiheuttamia muutoksia keskimääräisessä fluoresenssi-intensiteetissä eli markkeriproteiinin määrän muutoksia ko. proteiinin suhteen positiivisessa solupopulaatiossa. Tuloksista havaitaan, että solujen altistaminen SERM2:lle ja raloksifeenille (48 h) ennen PHA-aktivaatiota lisäsi solupinnan CD3:n määrää käsittelemättömiin kontrollisoluihin verrattuna ($p < 0,05$). CD4:n, CD25:n ja CD127:n määrät eivät muuttuneet tilastollisesti merkitsevästi, vaikkakin SERM2 ja raloksifeeni lisäsivät tulosten hajontaa (kuva 12). PHA-aktivaatio (24 h) yksinään ei vaikuttanut solupinnan CD3:n määrään (kuva 12). Tulokset osoittavat, että PHA käsittely ei ollut riittävä aktivoimaan Jurkat-soluja, sillä CD25:n (IL-2R) määrässä ei havaittu aktivaation jälkeen muutosta (kuva 12).



Kuva 12. Hormonien vaikutukset pintaproteiinien mediaani fluoresenssi-intensiteettiin (MFI) (B). Jurkat-solut altistettiin 48 h SERMeille (1 µM) ja aktivoitiin 24 h PHA:lla (10 µg/ml). Kaikki ryhmät on suhteutettu aktivaation perustasoon. Kuvaajissa on esitetty ryhmien keskiarvot ±SD. Tilastolliset merkitsevyydet on määritetty yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja parivertailut tehty Tukeyn testillä lukuun ottamatta CD3⁺CD4⁺ soluja, joiden testauksessa käytettiin Kruskal-Wallis testia ja parivertailuissa Dunnin testiä. * P < 0,05.

FOXP3-markkeria ei voitu käyttää fenotyypin määrittämisessä, sillä immunovärjäys ei optimointiyrityksistä huolimatta onnistunut. Soluista värjättiin kuitenkin IL-7-reseptorin alfa-alayksikkö CD127, jonka ekspression tiedetään korreloivan käänteisesti FOXP3-ekspression kanssa CD4⁺ T-soluissa (Liu ym. 2006). Tarkasteltaessa CD4⁺ Jurkat-solupopulaatiota CD25- ja CD127-pintaproteiinien suhteen huomataan, että suurin osa soluista ilmentää pinnallaan CD127-proteiinia, kun taas CD25-proteiinia ilmentää vain murto-osa soluista (kuva 13). Estrogeenisillä yhdisteillä ei ollut merkitsevää vaikutusta CD25⁺ tai CD127⁺ solujen osuuksiin.



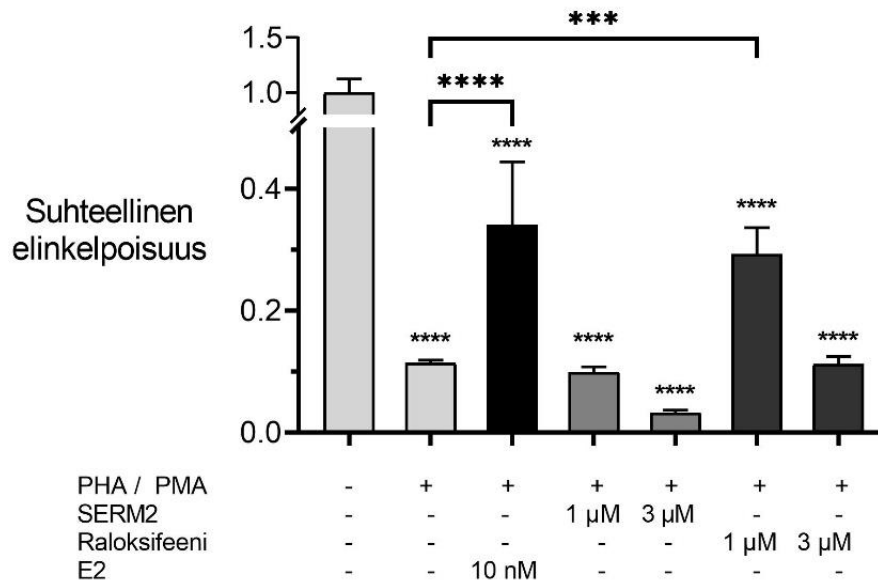
Kuva 13. CD25⁺ ja CD127⁺ solujen prosentuaaliset osuudet CD4⁺ Jurkat-solupopulaatiosta. Solut altistettiin 48 h SERMeille (1 µM) ja aktivoitiin 24 h PHA:lla (10 µg/ml), minkä jälkeen ne eroteltiin pintaproteiinien perusteella virtausytometrialla. Kuvaajassa on esitetty ryhmien keskiarvot ±SD.

3.2 Raloksifeeni ja E2 ylläpitävät solujen elinkelpoisuutta

Koska raloksifeeni ja SERM2 näyttivät vaikuttavan hieman solujen CD4:n, CD25:n ja CD127:n ekspressioon, haluttiin selvittää, olisiko estrogeenisillä yhdisteillä vaikutusta solujen elinkelpoisuuteen. Jurkat-solut päädyttiin aktivoimaan PHA:lla ja PMA:lla, sillä edellä immunofenotyypauksessa havaittiin, että PHA ei yksinään ole riittävä aktivoimaan soluja.

Solujen elinkelpoisuutta arvioitiin mittaamalla solujen metabolista aktiivisuutta Alamar Blue –viabiliteettireagenssilla. Tulokset eivät suoraan kerro elävien solujen määrää, vaan ainoastaan muutoksen solujen metabolisessa aktiivisuudessa. Taustaoletuksena on, että elävät solut ovat metabolisesti aktiivisia.

Kuten kuvasta 14 havaitaan, solujen estrogeeni- ja SERM-käsittelyt vähensivät tilastollisesti merkitsevästi metabolisesti aktiivisten solujen määrää käsittelemättömiin kontrollisoluihin verrattuna (p-arvo < 0,0001) (kuva 14). Kun estrogeeni- ja SERM-käsittelyjen vaikutuksia verrattiin PHA/PMA-aktivoituihin soluihin, havaittiin 10 nM E2:n ja 1 µM raloksifeenin ylläpitävän elinkelpoisuutta (kuva 14 hakasulut, p-arvo < 0,001).

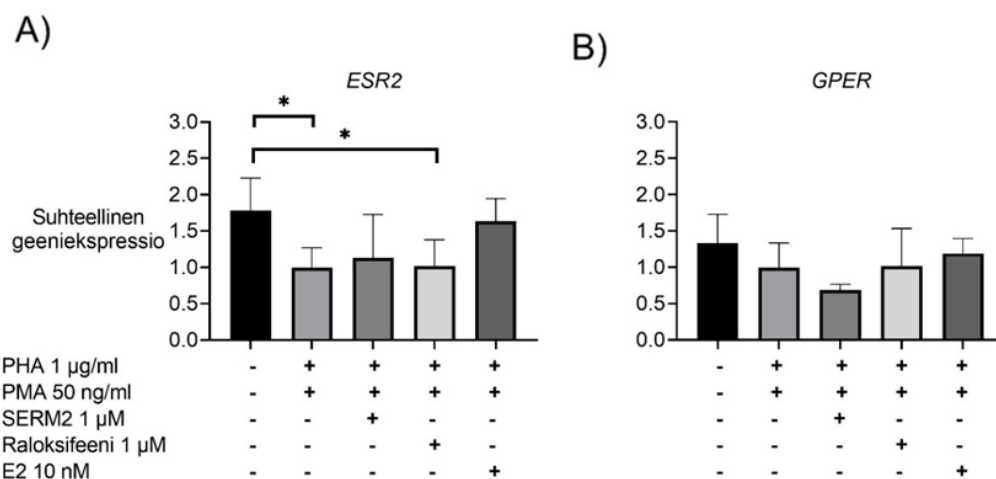


Kuva 14. E2:n ja SERMien vaikutukset Jurkat-solujen elinkelpoisuuteen. Jurkat-solut altistettiin 48 h SERMeille ja E2:lle ja aktivoitiin 24 h PHA:lla (1 μg/ml) ja PMA:lla (50 ng/ml). Solujen elinkelpoisuutta arvioitiin AlamarBlue –viabiliteettireangenssin avulla. Jokaisen ryhmän tuottaman fluoresenssin intensiteetti on suhteutettu käsittelemättömien solujen fluoresenssin intensiteetin perustasoon (kunkin ryhmän n = 6). Kuvaajassa on esitetty ryhmien keskiarvot ±SD. Tilastolliset merkitsevyydet on määritetty yksisuuntaisen varianssianalyysin (ANOVA) jälkeen kuvassa osoitettujen ryhmien välillä Tukeyn testillä, sekä vertaamalla kaikkia ryhmiä käsittelemättömään ryhmään Dunnettin testillä. *** P < 0,001; **** P < 0,0001.

3.3 Estrogeeniset vaikutukset ovat mahdollisesti ERβ- tai GPER-välitteisiä

Koska E2 ja raloksifeeni vaikuttivat solujen elinkelpoisuuteen, haluttiin seuraavaksi selvittää qPCR:llä, selittyvätkö estrogeenisten yhdisteiden elinkelpoisuutta lisäävät vaikutukset hormonireseptorien määrän lisääntymisellä. Estrogeenireseptori β:aa koodaavan *ESR2*-geenin ja G-proteiinikytkentäisen estrogeenireseptoria koodaavan *GPER1*-geenin ilmentyminen havaittiin, kun solut käsiteltiin 48 h estrogeenisillä yhdisteillä ja aktivoitiin 24 h PHA:lla ja PMA:lla (kuva 15). Jurkat-solujen PHA+PMA-aktivaatio laski ERβ:aa koodaavan *ESR2*-geenin lähetti-RNA-ekspressiota käsittelemättömiin kontrollisoluihin verrattuna (P = 0,040) (kuva 15a). *ESR2*:n lähetti-RNA-ekspressio väheni myös soluissa, jotka altistettiin raloksifeenille 48 h ajan ennen aktivaatiota (P = 0,048). Sen sijaan E2 vaikutti estävän aktivaation aiheuttaman *ESR2*:n lähetti-RNA-ekspression alenemisen (kuva 15a). SERM2:lla ei havaittu olevan vaikutusta *ESR2*-geenin ilmentymiseen.

Jurkat-solut ilmensivät myös *GPER1*-geenin lähetti-RNA:ta (kuva 15b), mutta estrogeeniset yhdisteet eikä aktivaatio vaikuttaneet *GPER1*:n ilmenemiseen tilastollisesti merkitsevästi. qPCR:llä ei havaittu estrogeenireseptori α :aa koodaavan *ESR1*-geenin ja progesteronireseptoreja A ja B koodaavan *PR*-geenin ilmentymistä vastaavissa kasvatusolosuhteissa (tuloksia ei näytetty).



Kuva 15. SERMien ja E2:n vaikutukset hormonireseptorien lähetti-RNA-ekspressioon Jurkat-soluissa. Jurkat-solut altistettiin 48 h SERMeille ja E2:lle ja aktivoitiin 24 h PHA:lla (1 μ g/ml) ja PMA:lla (50 ng/ml), minkä jälkeen soluista määritettiin estrogeenireseptori β :n (*ESR2*) ja G-proteiinikytkentäisen estrogeenireseptorin (*GPER1*) geenien lähetti-RNA-määrät. Geeniekspressio on suhteutettu aktivoitujen solujen perustasoon. Kuvaajissa on esitetty ryhmien keskiarvot \pm SD. Tilastolliset merkitsevyydet on määritetty yksisuuntaisen varianssianalyysin (ANOVA) jälkeen parivertailuin Dunnettin testillä. * $P < 0,05$.

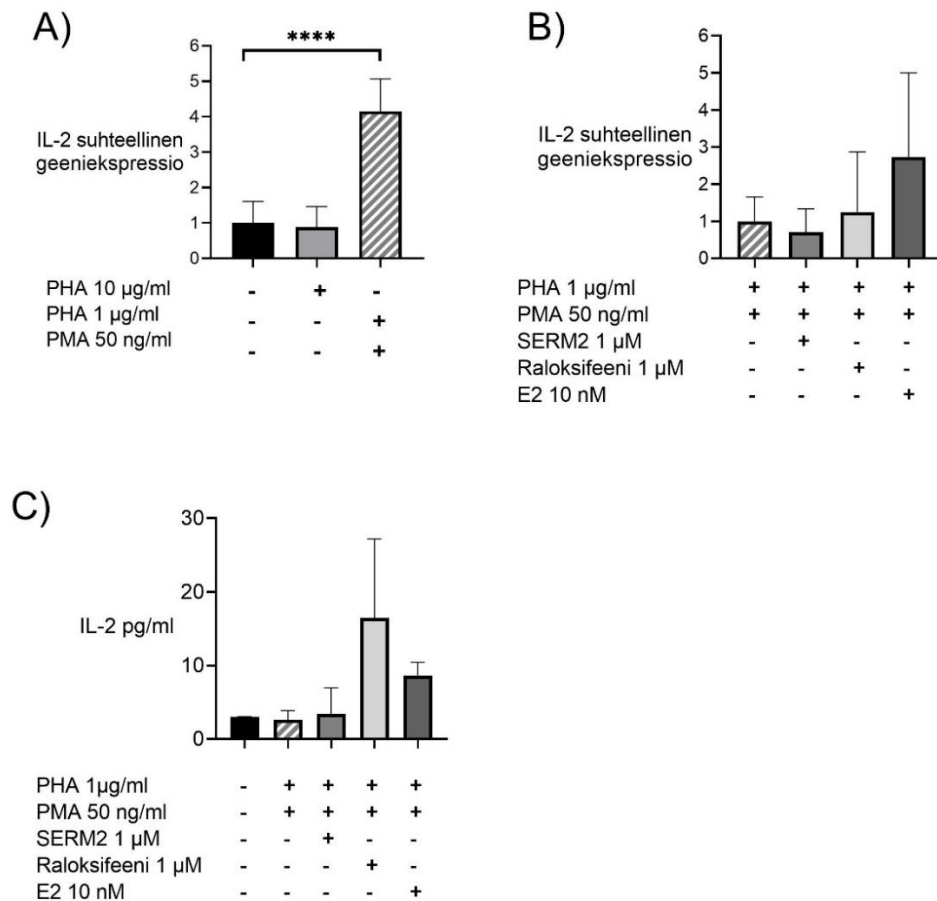
3.4 SERMien vaikutus Jurkat-solujen aktivaatioon

Koska aktivoituneiden T-solujen tiedetään tuottavan IL-2:ta, selvitimme seuraavaksi vaikuttavatko SERMit ja E2 Jurkat-solujen *IL-2*-geenin ilmentymiseen ja IL-2-proteiinin erittymiseen solusta eli moduloivatko estrogeeniset yhdisteet *IL2*-geenin transkriptioon johtavia signaalireittejä. Kuvasta 16a käy ilmi, että *IL2*-geenin transkriptioon vaadittiin solujen aktivaatio PHA:lla ja PMA:lla, mikä lähes nelinkertaisti IL-2:n lähetti-RNA:n ilmenemisen aktivoimattomiin kontrollisoluihin verrattuna ($p < 0,0001$) (kuva 16a). Tulos tukee edellä esitettyä tulosta siitä, että pelkkä PHA-aktivaatio ei riitä aktivoimaan tässä työssä käytettyä Jurkat-alalinjan soluja.

Vaikka PHA ja PMA lisäsivät solujen IL-2:n lähetti-RNA:n määrää, kasvatusmediumiin eritetyn IL-2:n määrät eivät tilastollisesti eronneet aktivoimattomien

tai aktivoitujen solujen välillä (kuva 16c) eikä siten solujen *IL2*-geenin transkriptionaalinen aktiivisuus ollut verrannollinen solusta ulos eritetyn IL-2:n kanssa.

Kun solut altistettiin raloksifeenille ja E2:lle 48 h ennen solujen PHA- ja PMA-aktivaatiota, IL-2:n lähetti-RNA:n määrä lisääntyi, mutta tulokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä aktivoituun kontrolliryhmään verrattuna (kuva 16b). Myöskään solusta ulos eritetyn IL-2:n määrissä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja (kuva 16c).

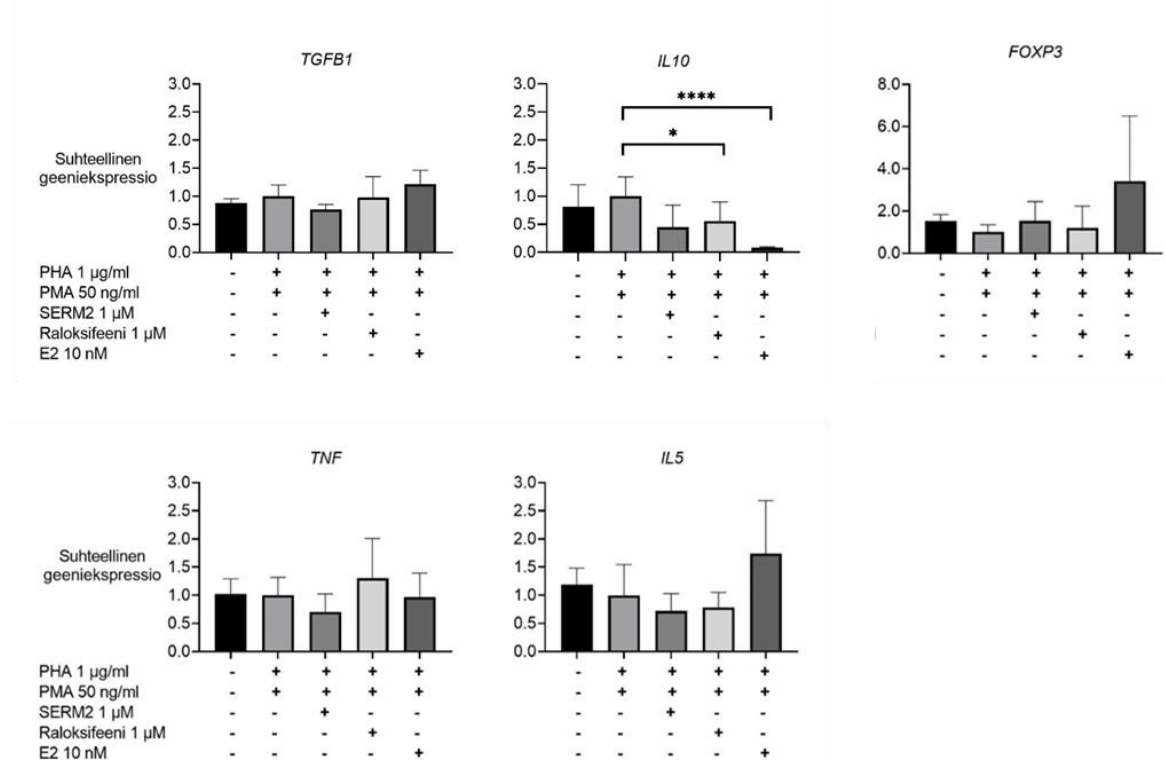


Kuva 16. Jurkat-solujen suhteellinen IL-2:n lähetti-RNA-ekspressio ja E2:n sekä SERMien vaikutus IL-2 -pitoisuuteen. A) Jurkat-solut aktivoitiin 24 h PHA:lla (10 µg/ml) tai PHA:lla (1 µg/ml) ja PMA:lla (50 ng/ml). Aktivoitujen solujen IL-2 lähetti-RNA-ekspressio suhteutettiin testiaineille altistamattomiin kontrollisoluihin. B) 48 h SERM- tai E2-altistettujen ja 24 h PHA+PMA-aktivoitujen solujen IL-2 lähetti-RNA-ekspressio suhteutettiin tupla-aktivoitujen solujen perustasoon. C) 48 h SERM- tai E2-altistettujen ja 24 h PHA+PMA-aktivoitujen solujen ELISA-menetelmällä mitatut solujen erittämät IL-2-pitoisuudet. Käsittelyryhmät on suhteutettu käsittelemättömään kontrolliryhmään. Kuvaajissa on esitetty ryhmien keskiarvot ±SD. Tilastolliset merkitsevyydet on määritetty yksisuuntaisen varianssianalyysin (ANOVA) jälkeen parivertailuin Tukeyn-testillä (A ja B) ja Kruskal-Wallis testillä (C). **** P < 0,0001.

3.5 E2 ja raloksifeeni vähensivät IL-10:n lähetti-RNA:n määrää

SERMien ja E2:n vaikutuksia selvitettiin myös muiden soluista ulos eritettävien sytokiini- ja interleukiinigeenien aktivaatioon. Solujen havaittiin tuottavan anti-inflammatoristen TGFβ:n, IL-10:n ja FOXP3:n lähetti-RNA:ta (kuva 17). Solujen altistaminen raloksifeenille 48 h ennen aktivaatiota vähensi solujen IL-10:n lähetti-RNA:n tuottoa ($P = 0,027$). E2-altistus puolestaan lähes lopetti IL-10:n lähetti-RNA:n ilmentämisen soluissa ($P < 0,0001$) (kuva 17). Käsittelyt eivät juurikaan vaikuttaneet TGFβ:n tai FOXP3:n lähetti-RNA:n ilmenemiseen.

SERMeillä tai E2:lla ei ollut vaikutusta tulehdusta edistävien TNFα:n ja IL-5:n geenien ilmentymiseen (kuva 17). Muiden tutkittujen interleukiinien eli IL-1β, IL-4, IL-6, IL-17 sekä CCL5-kemokiinin ja IFNγ-sytokiinin lähetti-RNA-määrät jäivät havaintorajan alle (tuloksia ei esitetty).



Kuva 17. SERMien ja E2:n vaikutukset aktivoitujen Jurkat-solujen ilmentämien anti-inflammatoristen (TGFβ, IL-10, FOXP3) ja pro-inflammatoristen (TNFα, IL-5) proteiinien lähetti-RNA-ekspressioon. Solut altistettiin 48 h SERMeille ja E2:lle ja aktivoitiin 24 h PHA:lla ja PMA:lla. Geeniekspressio on suhteutettu aktivoitujen solujen perustasoon. Kuvaajissa on esitetty ryhmien keskiarvot ±SD. Tilastolliset merkitsevyydet määritetty yksisuuntaisen varianssanalyysin (ANOVA) jälkeen parivertaluin Dunnettin testillä. * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$

4 Tulosten tarkastelu

4.1 *Jurkat-solujen aktivaatio saattaa muuttaa niiden metaboliaa*

Solujen elinkelpoisuusmittauksessa havaittiin, että solujen aktivaatio vähensi metabolisesti aktiivisten solujen määrää. Syynä saattaa olla solujen kuoleminen, sillä T-soluaktivaation seurauksena osa soluista ajautuu apoptoosiin (Häcker ym. 2006). Lisäksi aktivaatioon käytetyn PMA:n on myös osoitettu indusoivan Jurkat-solujen apoptoosia (Busuttill ym. 2002).

Toisaalta kaikki elinkelpoisuusmittauksessa havaitut muutokset eivät välttämättä johdu solujen kuolemisenesta, sillä PMA:n on todettu jopa suojaavan Jurkat-soluja esimerkiksi metyyli glyoksaalin aiheuttamalta apoptoosilta (Takagi ym. 2004). Onkin mahdollista, että aktivoituneet solut siirtyvät käyttämään energiantuotannossaan aerobista glykolyysiä, minkä seurauksena solujen mitattu elinkelpoisuus laskee.

Aerobinen glykolyysi tai Warburgin efekti on syöpäsolujen yleinen tapa tuottaa energiaa glykolyysillä huolimatta siitä, että happea olisi saatavilla myös oksidatiiviseen fosforylaatioon, jossa energiansaanti on suurempi. Aerobisessa glykolyysissä glukoosi fermentoidaan laktaatiksi sen sijaan, että se hapetettaisiin täydellisesti mitokondrioissa. Ilmiön syyksi on ehdotettu esimerkiksi syöpäsolujen geenien toiminnan muutoksia ja mitokondrioiden toimintahäiriöitä, mutta ilmiön todellista taustaa ei tunneta (Asgari ym. 2015).

Näennäisesti havaitut elinkelpoisuuden muutokset eivät siis välttämättä kerro solujen todellisesta tilasta, sillä käytetyn menetelmän oletuksena on, että solut hyödyntävät energiantuotossaan mitokondrioissa tapahtuvaa oksidatiivista fosforylaatiota. Koska aerobinen glykolyysi on oksidatiivista fosforylaatiota tehottomampi tapa tuottaa ATP:tä, on siitä oltava soluille jotain muuta hyötyä. Kuten useimmat syöpäsolut, Jurkat-solut kasvavat nopeasti ja jakautuvat usein. Onkin ehdotettu, että jakautuvat solut ovat riippuvaisia aerobisesta glykolyysistä kyetäkseen tuottamaan riittävästi biomassaa tytärsolujen muodostukseen (Vander Heiden ym. 2009).

Jurkat-solujen energiantuottotapa ei välttämättä kytkeydy ainoastaan niiden syöpäsoluistaan, sillä myös aktivoituneet T-solut hyödyntävät aerobista glykolyysiä (Menk ym. 2018). Chang ym. (2013) ovat näyttäneet, että hiirten vaikuttaja-T-solujen aktivaatio ja proliferaatio tapahtuu normaalisti ilman aerobista glykolyysiä, mutta solujen IFN γ :n lähetti-RNA:n translaatio proteiiniksi tapahtuu aerobisen glykolyysin

aikana (Chang ym. 2013). Jurkat-solut eivät kuitenkaan ilmentäneet IFN γ :n lähetti-RNA:ta. IFN γ -aktiivisuuden puuttuminen Jurkat-soluilta ei kuitenkaan ole odottamatonta, sillä syöpäsoluina niiden ei ole kannattavaa tuottaa immuunipuolustusta voimakkaasti aktivoivaa sytokiinia. Samasta syystä Jurkat-soluissa ei havaittu myöskään IL-1 β :n lähetti-RNA:ta, sillä sekin on voimakas tulehdusvasteiden välittäjä.

4.2 E2 ja raloksifeeni parantavat Jurkat-solujen selviytymistä

Tutkimuksessani havaitsin, että Jurkat-solujen altistaminen 10 nM E2:lle tai 1 μ M raloksifeenille suojasi soluja aktivaation mahdollisesti haitallisilta vaikutuksilta. Vastaavia tuloksia on saatu ennenkin, kun E2:n on havaittu lisäävän solujen selviytymistä edistävän ja apoptoosia inhiboivan Bcl-2-proteiinin lähetti-RNA:ta rintaja rintasyöpäsoluissa (Gompel ym. 2000).

Elinkelpoisuuden näennäinen parantuminen voi johtua myös siitä, että E2 ja raloksifeeni ovat toimineet Jurkat-soluissa mitogeenien tavoin eli ovat käynnistäneet solunjakautumisen. Estrogeenien vasteet voivat olla joko suoraan tai epäsuorasti tiettyjen geenien aktivaatiota lisääviä (ns. genomisen signaalintireitti) tai erilaisten proteiinikinaasien aktivoitumista (ns. ei-genomisen signaalintireitti) (Vrtačnik ym. 2014). E2:n on havaittu indusoivan mitogeenilla aktivoituneen proteiinikinaasin (MAPK) nopean aktivoitumisen nisäkäs soluissa (Improta-Brears ym. 1999) sekä fosfatidyliinositoli-3-kinaasin (PI3K) aktivaation ihmisen rintasyöpäsoluissa (van der Burg ym. 1988; Castoria ym. 2001). PI3-kinaasi aktivoi omia kohdeproteiinejaan, jotka säätelevät useita solun biologisia toimintoja kuten geeniekspressiota, solusykliä, eloonjäämistä, solujen transformaatiota ja onkogeneesiä (Coffer ym. 1998).

Jurkat-solut ilmensivät G-proteiinikytkettyä estrogeenireseptoria (GPER1), joten elinkelpoisuutta lisäävät vaikutukset välittyivät mahdollisesti ei-genomisen GPER1:n aktivoiman proteiinikinaasikaskaadin välityksellä. Tätä tukee Noda-Seinon tutkimusryhmän tulos, jonka mukaan E2:n ja raloksifeenin indusoima osteoblastien proliferaatio tapahtuu GPER1:n kautta (Noda-Seino ym. 2013). Tutkimuksessani Jurkat-solut altistettiin estrogeenisille yhdisteille 48 h ennen aktivaatiota, joten mitogeeniset vaikutukset ovat voineet tapahtua nopean ei-genomisen signaalintireitin lisäksi myös hitaamman genomisen signaalintireitin kautta. Koska Jurkat-solut eivät ilmentäneet ER α :aa, jonka kautta genomisen signaloinnin on osoitettu tapahtuvan (Heldring ym. 2007), suoran genomisen signaloinnin tulisi tapahtua jonkun muun reseptorin kautta.

Jatkotutkimuksissa elinkelpoisuusmittauksen yhteydessä olisi hyödyllistä laskea solut estrogeenialistuksen jälkeen, mutta ennen aktivaatiota, jolloin estrogeenisten yhdisteiden mahdolliset vaikutukset solujen lukumäärään pystytään analysoimaan tarkemmin.

4.3 Estrogeeniset vaikutukset T-solujen metaboliaan saattavat olla ER β -välitteisiä

Ei täysin tiedetä, mitä kautta hormonaaliset vaikutukset välittyvät T-soluihin ja aiheesta julkaistut tutkimustulokset ovat osittain ristiriitaisia. Estrogeenisten vaikutusten on ehdotettu välittyvän T-soluihin muiden solutyypin, kuten antigeeniä esittelevien dendriittisolujen kautta (Bebo ym. 2009; Polanczyk ym. 2006). Toiset tutkimukset puolestaan korostavat T-solujen ER α :n välityksellä tapahtuvaa signalointia (Lélu ym. 2011; Liu ym. 2003).

Tutkimukseni perusteella näyttää kuitenkin siltä, että estrogeenisillä yhdisteillä voidaan vaikuttaa T-solujen metaboliseen aktiivisuuteen ER α :sta riippumatonta reittiä, koska E2 ja raloksifeeni lisäsivät ER α -negatiivisten Jurkat-solujen metabolista toimintaa, joka oli ensin vähentynyt solujen aktivaation seurauksena. Genomiset vaikutukset saattavat välittyä soluihin ER β :n kautta, sillä kaikki tutkimuksemme estrogeeniset yhdisteet sitoutuvat ER β :an (Barkhem ym. 1998; Polari ym. 2019). SERM2:n vaikutus Jurkat-soluissa lienee antagonistinen eli SERM2 sitoutuu ER β :aan, mutta estää reseptoria aktivoitumasta, sillä SERM2 on tutkimuksemme ainoa estrogeeninen yhdiste, joka ei näytä vaikuttavan Jurkat-solujen metaboliaan.

Havaitsemani tulos voi johtua myös siitä, että eri ligandit muodostavat estrogeenireseptorien kanssa komplekseja, jotka välittävät erilaisia vasteita. Tämä voi tarkoittaa sitä, että SERM2 säätelee T-soluissa eri geenien transkriptiota kuin E2 ja raloksifeeni. Toisaalta SERM2 saattaa säädellä myös samoja geenejä kuin E2 ja raloksifeeni, mutta aktivoimalla esimerkiksi eri transkriptiotekijöitä. Kaikki ER:ien vaikutukset eivät tapahdu genomitasolla, vaan kyse voi olla erilaisista solutason vasteista, kuten translaation jälkeen tapahtuvan muokkauksen säätelystä.

Polari ym. (2018) ovat aikaisemmin osoittaneet, että korkea SERM2-pitoisuus inhiboi primaaristen T-solujen proliferaatiota. Omassa tutkimuksessani en havainnut solujen proliferaation heikentyneen soluviljelyn aikana. Toisaalta en varsinaisesti tutkinut solujen proliferaatiota, sillä syöpäsolut proliferoituvat yleensä erinomaisesti ulkoisista

tekijöistä riippumatta. Ilman lisätutkimuksia ei voi sanoa, olisiko Jurkat-solujen proliferaatiokyvyssä tapahtunut muutoksia, jos solut olisivat ilmentäneet myös ER α :a. Aikaisemman tutkimustuloksen mukaan SERMien vaikutus T-solujen proliferaatioon ei kuitenkaan vaadi ER α :n ilmentämistä (Bebo ym. 2009). Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista varmistaa, välittyvätkö SERM2:n proliferaatiovaikutukset T-soluihin nimenomaan ER β :n kautta.

4.4 Estrogeeniset yhdisteet eivät ohjaa Jurkat-soluja kohti regulatorista fenotyyppiä

Regulatoriset T-solut (Treg) säätelevät immuunijärjestelmän muita soluja ja osallistuvat immunologisen toleranssin kehitykseen ja ylläpitoon. Koska estrogeenit lisäävät Treg-solujen ilmenemistä ja tukevat solujen regulatorisia ominaisuuksia (Adurthi ym. 2017; Tai ym. 2008), halusin arvioida tutkimuksessani estrogeenisten yhdisteiden vaikutuksia myös Jurkat-soluihin.

Luontaisesti Treg-solujen CD127-ekspressio on alhainen (Yu ym. 2012), mutta havaitsin, että suurin osa tutkimuksen CD4⁺ Jurkat-soluista ilmentää tätä IL-7-reseptorin alfa-alayksikköä (CD127). Näin ollen käyttämäni Jurkat-solut eroavat fenotyyppiltään primaarisista Treg-soluista. Tämän lisäksi vain pieni osa Jurkat-soluista ilmensi CD25-pintaproteiinia, mikä on yleinen Treg-solujen markkeri. SERMit eivät vaikuttaneet CD25:n tai CD127:n ilmenemiseen. Vähäinen CD25-pintaproteiinin ilmeneminen saattaa estää Jurkat-soluja erilaistumasta toiminnallisesti erilaisiksi T-solupopulaatioiksi, sillä CD4⁺ T-solujen erilaistuminen esimerkiksi Th1- tai Th2-soluiksi on riippuvainen IL-2:n erityksen lisäksi myös CD25:n ilmenemisestä soluissa (Balkhi ym. 2015; Zhu ym. 2010).

Vaikka Jurkat-solut eivät tutkittujen pintaproteiinien perusteella muistuttaneet Treg-soluja, tarkastelin Treg-soluille ominaisen FOXP3:n ilmenemistä lähetti-RNA:n tasolla. CD25:n puuttuminen ei estä muiden Treg-soluille ominaisten proteiinien ilmenemistä ja esimerkiksi hiiriltä tunnetaan solupopulaatioita, jotka ovat CD25-negatiivisuudesta huolimatta FOXP3-positiivisia (Wing & Sakaguchi 2019). Havaitsin, että E2 lisää hieman solujen FOXP3:n lähetti-RNA-ekspressiota. Vuonna 2018 julkaistussa tutkimuksessa akuutin lymfoblastisen leukemian T-soluista hiljennettiin *FOXP3*-geeni, mikä johti solujen kasvun vähenemiseen ja apoptoottisen morfologian esiintymiseen (Yonekura ym. 2018). Tutkimus osoitti, että FOXP3 tukee

T-solujen kasvua ainakin tutkimuksessa käytetyissä Jurkat- ja KOPT-K1-solulinjoissa. Tässä pro gradu -työssä tehdyt havainnot osoittavat, että FOXP3:n T-solujen kasvua tukeva vaikutus saattaa olla ainakin osittain estrogeeniresponsiivinen.

Syöpäsolujen, regulatorisen fenotyypin ja ER α -ekspression välillä saattaa olla yhteys, sillä ER α :n poistaminen hiirten T-soluista lisää solujen FOXP3-ekspressiota (Mohammad ym. 2018), mutta ihmisen kohdunkaulan syöpäkudoksesta eristettyjen Treg-solujen FOXP3-ekspressio vähenee ja solujen regulatoriset ominaisuudet heikkenevät, kun ER α :n kautta tapahtuva signaalointi estetään (Adurthi ym. 2017). Kyse voi olla lajien välisistä eroista tai solujen assosiaatio syöpäsolujen kanssa jotenkin muuttaa ER α :n ja FOXP3-ekspression välistä yhteyttä. Tutkimukseni perusteella ER α -negatiiviset Jurkat-solut eivät muistuttaneet fenotyypiltään Treg-soluja, mikä saattaa tukea edellä mainittua yhteyttä syöpäsolujen, regulatorisen fenotyypin ja ER α :n välillä. Mainittakoon kuitenkin, että FOXP3:n ilmeneminen ei yksinään kerro solujen todellisista regulatorisista ominaisuuksista. Esimerkiksi kaikilla ihmisten CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ perifeerisillä Treg-soluilla ei ole Treg-solujen tyypillisiä supressiivisia ominaisuuksia (Sakaguchi ym. 2010).

4.5 Estrogeeniset yhdisteet eivät vaikuta IL-2:n tai sen reseptorin ilmenemiseen Jurkat-soluissa

Tutkimuksessani huomasiin, että Jurkat-solujen IL-2:n lähetti-RNA-määrien muutokset eivät jostain syystä heijastu eritettäviin proteiinimääriin. Tämä ei sinänsä ole yllättävää, sillä lähetti-RNA:n määrä ei aina korreloi tuotetun proteiinin määrän kanssa (Maier ym. 2009). Kaikki Jurkat-alalinjat eivät myöskään eritä IL-2-proteiinia (Pawelec ym. 1982). On mahdollista, että IL-2:n proteiinisynteesi ei tapahdu loppuun asti tai valmista proteiinia ei eritetä ulos soluista. Vaikka Jurkat-solujen IL-2-signalointi on lähes normaalien T-solujen kaltaista, *IL-2*-geenin luentaan osallistuvien transkriptiotekijöiden osuuksissa on vähäisiä eroja (Hughes & Pober 1996). Tulee ottaa huomioon, että tutkimuksissa käytetyt Jurkat-solut ovat syöpäsoluja, jotka proliferoituvat myös ilman IL-2:sta riippuvaa aktivaatiota.

Tässä tutkimuksessa käytetyt estrogeeniset yhdisteet eivät vaikuttaneet tilastollisesti merkitsevästi soluista eritetyn IL-2:n määrään, vaikkakin E2 näytti hieman lisäävän IL-2:n lähetti-RNA:n määrää SERMeihin verrattuna. Aikaisemman tutkimuksen mukaan E2 ei vaikuta T-solujen IL-2:n tuottoon, mutta ER β -agonisti lisää T-solujen IL-2:n

tuottoa (Priyanka ym. 2013). Tutkimistani estrogeenisista yhdisteistä E2 on ER β :n voimakkain agonisti, mikä saattaa selittää E2:n aiheuttaman vähäisen muutoksen IL-2:n lähetti-RNA:n määrässä.

Se, että Jurkat-soluista ei havaittu IL-2:n lähetti-RNA:ta tai liukoista proteiinia voi johtua myös tutkimusasetelmasta. Aikaisemmin on havaittu, että hiiren naiivit CD4⁺ T-solut erittävät maksimaalisesti IL-2:sta jo 6 – 8 tunnin kuluttua solujen aktivaatiosta *in vivo* ja että 20 – 24 tunnin kohdalla IL-2:ta ei enää havaita (Sojka ym. 2004). Koska mittasin IL-2:n määrän ainoastaan 24 tuntia solujen aktivaatiosta, nopeita vasteita ei tutkimuksessani havaittu. E2:lle ja raloksifeenille altistetuista soluista ei myöskään havaittu muutoksia IL-2:n lähetti-RNA:n määrässä. On todennäköistä, että valittu aikapiste oli liian myöhäinen IL-2 geenin aktivaation havaitsemiseksi.

Estrogeenien tiedetään vaikuttavan IL-2-reseptorin (CD25) ilmenemiseen. Esimerkiksi primaaristen T-solujen aktivaatio lisää ensin IL-2-reseptorin ilmenemistä, mutta aktivaation jälkeinen altistus E2:lle inhiboi reseptorin ilmenemistä (McMurray ym. 2001). Vastaavaa ei kuitenkaan näytä tapahtuvan Jurkat-soluilla, sillä en havainnut CD25-ekspressiossa muutoksia aktivoiduissa ja SERM-yhdisteillä käsitellyissä Jurkat-soluissa. Myöskään McMurray ym. (2001) eivät havainneet muutoksia aktivoitujen ja E2:lla käsiteltyjen solujen CD25-ekspressiossa. Samaisessa McMurrayn tutkimuksessa osoitettiin, että estrogeeni inhiboi IL-2-reseptorin ilmenemistä naisilla ja että naisten perifeeriset lymfosyytit ilmensivät IL-2 -reseptoria vähemmän kuin miesten solut (McMurray ym. 2001). Kleinin ja Flanaganin tutkimus (2016) osoitti, että sukupuolten välillä on eroja CD4⁺ T-solujen sytokiinivasteissa. Edellä mainitut tutkimukset osoittavat, että sukupuoli on huomioitava yhtenä biologisena muuttujana immunologisissa tutkimuksissa. Esimerkiksi Jurkat-solut, joita käytetään paljon T-solututkimuksissa, ovat aikanaan eristetty nuoren miehen verestä, mikä voi vaikuttaa solujen myöhempään vasteisiin sukupuolihormoneille.

4.6 E2 vähentää anti-inflammatorisen IL-10:n ilmenemistä Jurkat-soluissa

Pro gradu -työssä havaitsin raloksifeenin ja etenkin E2:n alentavan huomattavasti Treg- ja Th2-solujen erittämän, tulehdusreaktioita hillitsevän IL-10:n lähetti-RNA:n ekspressiota. Tulos poikkeaa käsityksestä, jonka mukaan E2 lisää T-solujen IL-10:n tuottoa (Gilmore ym. 1997; Straub 2007). Voi hyvinkin olla, että Jurkat-soluissa

estrogeniriippuvainen IL-10:n ilmeneminen vaatii ympäristön, jossa on myös muita soluihin vaikuttavia aineita, kuten sytokiineja (ns. sytokiiniympäristö). Esimerkiksi makrofageilla estrogeeni indusoi IL-10:n lähetti-RNA:n ilmenemisen, kunhan solut altistuvat samanaikaisesti myös IL-4:lle (Villa ym. 2015). Vastaavaa tulosta en havainnut Jurkat-soluilla, sillä ne eivät ilmentäneet IL-4:n lähetti-RNA:ta. Aikaisemmin on osoitettu, että SERM2 lisää IL-10:n ja IL-4:n tuottoa paksusuolen soluissa, muuttamatta kuitenkaan näiden interleukiinien määriä verenkierrossa (Polari ym. 2019). Tutkimuksessani en havainnut vastaavaa Jurkat-soluissa. On hyvin todennäköistä, että eri solutyypeillä on oma spesifinen sytokiiniympäristö, joka mahdollistaa tiettyjen sytokiinigeenien aktivaation. Lisäksi SERM2:n vaikutukset sytokiinituotantoon vaihtelevat solutyypin välillä.

4.7 Yhteenveto

Jurkat-solujen elinkelpoisuudessa havaittiin aktivaation seurauksena muutoksia, jotka voivat johtua muutoksista solujen metaboliassa. Solujen elinkelpoisuus on voinut oikeasti myös heiketä, sillä osa aktivoituneista T-soluista ajautuu apoptoosiin. E2 ja raloksifeeni vaikuttivat kuitenkin suojaavan soluja aktivaation haitallisilta vaikutuksilta. Jatkossa tulisi selvittää, välittävätkö estrogeeniset yhdisteet todella suojaavia vaikutuksia soluissa vai toimivatko ne mitogeenien tavoin. Mitogeenien kaltaisia vaikutuksia välittävien estrogeenisten yhdisteiden tunnistaminen voi hyödyttää etenkin hormoniresponsivisten syöpien, kuten rintasyövän, tutkimuksessa.

Estrogeeniset vaikutukset välittyvät ER α -negatiivisiin Jurkat-soluihin mahdollisesti GPER1:n tai ER β :n kautta. Uusi SERM2 saattaa kuitenkin toimia Jurkat-soluissa antagonistina, toisin kuin E2 ja raloksifeeni.

Estrogeeniset yhdisteet eivät ohjanneet Jurkat-soluja kohti regulatoristen T-solujen kaltaista fenotyyppiä. Yllättäen E2 jopa vähensi anti-inflammatorisen IL-10:n lähetti-RNA:n ilmenemistä. Uutta tietoa estrogeenisten yhdisteiden vaikutuksista immuunipuolustuksen soluihin saadaan jatkuvasti, mutta edelleen tarvitaan lisää tutkimuksia, jotta immuunivasteiden säätely SERMeillä tulisi mahdolliseksi.

5 Lähteet

- Adurthi, S., Kumar, MM., Vinodkumar, HS., Mukherjee, G., Krishnamurthy, H., Acharya, KK., Bafna, DK., Uma, DK., Abhishekh, B. Krishna, S., Parchure, A., Alka, M. and Jayshree, RS. (2017) Oestrogen receptor- α binds the FOXP3 promoter and modulates regulatory T-cell function in human cervical cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 17289.
- Altman, A., Theofilopoulos, AN., Weiner, R., Katz, DH. and Dixon, FJ. (1981) Analysis of T cell function in autoimmune murine strains: Defects in production of and responsiveness to interleukin 2. *Journal of Experimental Medicine*, 154(3), 791–808.
- Apelgren, LD., Bailey, DL., Fouts, RL., Short, L., Bryan, N., Evans, GF., Sandusky, GE., Zuckerman, SH., Glasebrook, A. and Bumol, TF. (1996) The effect of a selective estrogen receptor modulator on the progression of spontaneous autoimmune disease in MRL lpr/lpr mice. *Cellular immunology*, 173(1), 55–63.
- Aranow, C., Diamond, B. and Mackay, M. (2019) Systemic Lupus Erythematosus. Teoksessa R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. F. Frew, & C. M. Weyland (toim.), *Clinical Immunology* (viides painos, ss. 685-704).
- Areia, A., Vale-Pereira, S., Alves, V., Rodrigues-Santos, P., Moura, P. and Mota-Pinto, A. (2015) Membrane progesterone receptors in human regulatory T cells: a reality in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 122(11), 1544–1550.
- Aronica, SM., Kraus, WL. and Katzenellenbogen, BS. (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8517–8521.
- Asgari, Y., Zabihinpour, Z., Salehzadeh-Yazdi, A., Schreiber, F. and Masoudi-Nejad, A. (2015) Alterations in cancer cell metabolism: The Warburg effect and metabolic adaptation. *Genomics*, 105(5–6), 275–281.
- Bain, DL., Heneghan, AF., Connaghan-Jones, KD. and Miura, MT. (2007) Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 201–220.
- Baker, VL., Leitman, D. and Jaffe, RB. (2000) Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstetrical & gynecological survey*, 55(7 Suppl 2), S21-47.
- Balkhi, MY., Ma, Q., Ahmad, S. and Junghans, RP. (2015) T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. *Cytokine*, 71, 339–347.
- Banda, M., Bommineni, A., Thomas, RA., Luckinbill, LS. and Tucker, JD. (2008) Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 649(1–2), 126–134.
- Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J. and Ko, CMJ. (2016) Extra-gonadal sites of

estrogen biosynthesis and function. *BMB Reports*, Vsk. 49, ss. 488–496.

Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, JÅ. and Nilsson, S. (1998) Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology*, 54(1), 105–112.

Bebo, BF., Dehghani, B., Foster, S., Kurniawan, A., Lopez, FJ., Sherman, LS. and Sherman, LS. (2009) Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, 57(7), 777–790.

Bernardi, AI., Andersson, A., Stubelius, A., Grahemo, L., Carlsten, H. and Islander, U. (2015) Selective estrogen receptor modulators in T cell development and T cell dependent inflammation. *Immunobiology*, 220(10), 1122–1128.

Bohner, P., Chevalier, MF., Cesson, V., Rodrigues-Dias, SC., Dartiguenave, F., Burruni, R., Tawadros, T., Valerio, M., Lucca, I., Nardelli-Haeffliger, D., Jichlinski, P. and Derré, L. (2019) Double positive CD4+CD8+ T cells are enriched in urological cancers and favor T helper-2 polarization. *Frontiers in Immunology*, 10.

Busuttill, V., Bottero, V., Frelin, C., Imbert, V., Ricci, JE., Auberger, P. and Peyron, JF. (2002) Blocking NF- κ B activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene*, 21, 3213–3224.

Capellino, S., Riepl, B., Rauch, L., Angele, P., Cutolo, M. and Straub, RH. (2007) Quantitative determination of steroid hormone receptor positive cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: is there a link to inflammation? *Annals of the rheumatic diseases*, 66(1), 53–58.

Caspi, RR. (2003) Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Current Protocols in Immunology*, 53(1), 15.6.1-15.6.20.

Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., De Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, MV. and Auricchio, F. (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO Journal*, 20(21), 6050–6059.

Chang, CH., Curtis, JD., Maggi, LB., Faubert, B., Villarino, AV., O’Sullivan, D., Huang, SC., van der Windt, GJ., Blagih, J., Weber, JD., Pearce, EJ., Jones, RG. and Pearce, EL. (2013) Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 153(6), 1239–1251.

Chetty, R. & Gatter, K. (1994) CD3: Structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *The Journal of Pathology*, 173(4), 303–307.

Clarke, CL. & Graham, JD. (2012) Non-overlapping progesterone receptor cistromes contribute to cell-specific transcriptional outcomes. *PLoS ONE*, 7(4).

Coffer PJ., Jin, J. and Woodgett, JR. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochemical Journal*, 335, 1–13.

Condon, JC., Hardy, DB., Kovaric, K. and Mendelson, C. R. (2006) Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of

nuclear factor- κ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Molecular Endocrinology*, 20(4), 764–775.

Correale, J., Arias, M. and Gilmore, W. (1998) Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4⁺ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *Journal of immunology*, 161(7), 3365–3374.

Curtsinger, JM., Schmidt, CS., Mondino, A., Lins, DC., Kedl, RM., Jenkins, MK. and Mescher, MF. (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Journal of immunology*, 162(6), 3256–3262.

de Jong, E., Suddason, T. and Lord, GM. (2010) Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. *Clinical and experimental immunology*, 159(2), 148–158.

de Kozak, Y., Andrieux, K., Villarroya, H., Klein, C., Thillaye-Goldenberg, B., Naud, MC., Garcia, E. and Couvreur, P. (2004) Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *European Journal of Immunology*, 34(12), 3702–3712.

Dutertre, M. & Smith, CL. (2000) Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(2), 431–437.

Eagar, TN. & Miller, SD. (2019) Helper T-cell subsets and control of the inflammatory response. Teoksessa R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, & C. M. Wyeand (toim.), *Clinical Immunology* (viides painos, ss. 235-245).

Erlandsson, MC., Gömöri, E., Taube, M. and Carlsten, H. (2000) Effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on thymus, T cell reactivity, and inflammation in mice. *Cellular immunology*, 205(2), 103–109.

Figueiredo, AS. & Schumacher, A. (2016) The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology*, 148(1), 13–21.

Fox, EM., Davis, RJ. and Shupnik, MA. (2008) ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids*, 73(11), 1039–1051.

Fox, HS., Bond, BL. and Parslow, TG. (1991) Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *Journal of immunology*, 146(12), 4362–4367.

Garg, D., Ng, SSM., Baig, KM., Driggers, P. and Segars, J. (2017) Progesterone-mediated non-classical signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(9), 656–668.

Gilmore, W., Weiner, LP. and Correale, J. (1997) Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(1), 446–451.

Goldstein, S. (2006) Not all Serms are created equal. *Menopause*, 13(3), 325–327.

- Gompel, A., Somaï, S., Chaouat, M., Kazem, A., Kloosterboer, HJ., Beusman, I., Forgez, P., Mimoun, M., Rostène, W. (2000). Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids*, 65(10–11), 593–598.
- Grant, CR., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. and Longhi, MS. (2015) Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmunity reviews*, 14(2), 105–116.
- Gruber, CJ., Tschugguel, W., Schneeberger, C. and Huber, JC. (2002) Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine*, 346(5), 340–352.
- Häcker, G., Bauer, A. and Villunger, A. (2006) Apoptosis in activated T cells: What are the triggers, and what the signal transducers? *Cell Cycle*, 5, 2421–2424.
- Hedrich, CM., Crispin, JC., Rauen, T., Ioannidis, C., Apostolidis, SA., Lo, MS., kyttaris, VC. and Tsokos, GC. (2012) cAMP response element modulator controls IL2 and IL17A expression during CD4 lineage commitment and subset distribution in lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16606–16611.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., tujaque, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M. and Gustafsson, JÅ. (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931.
- Herynk, MH. & Fuqua, SAW. (2004) Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine Reviews*, 25(6), 869–898.
- Hughes, CCW., & Pober, JS. (1996) Transcriptional regulation of the interleukin-2 gene in normal human peripheral blood T cells: convergence of costimulatory signals and differences from transformed T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5369–5377.
- Improta-Brears, T., Whorton, AR., Codazzi, F., York, D., Meyer, T. and McDonnell, DP. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4686–4691.
- Inui, A., Ogasawara, H., Naito, T., Sekigawa, I., Takasaki, Y., Hayashida, Y., Takamori, K. and Ogawa, H. (2007) Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, 26(10), 1675–1678.
- Ishizuka, M., Hatori, M., Suzuki, T., Miki, Y., Darnel, AD., Tazawa, C., Sawai, T., Uzuki, M., Tanaka, Y., Kokubun, S. and Sasano, H. (2004) Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clinical Science*, 106(3), 293–300.
- Jordan, VC. (2001) Selective estrogen receptor modulation: A personal perspective. *Cancer Research*, 61(15), 5683–5687.
- Jordan, VC. (2014) Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 21(3), R235-46.
- Khan, D. & Ahmed, SA. (2015) The immune system is a natural target for estrogen action: Opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. *Frontiers*

in *Immunology*, 6, 635.

Khan, D., Dai, R., Karpuzoglu, E. and Ahmed, SA. (2010) Estrogen increases, whereas IL-27 and IFN- γ decrease, splenocyte IL-17 production in WT mice. *European Journal of Immunology*, 40(9), 2549–2556.

Klein, SL. & Flanagan, KL. (2016) Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638.

Kovats, S. (2015) Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63–69.

Ledderose, C., Heyn, J., Limbeck, E. and Kreth, S. (2011) Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC Research Notes*, 4, 427.

Lee, JH., Lydon, JP. and Kim, CH. (2012) Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability. *European Journal of Immunology*, 42(10), 2683–2696.

Lélu, K., Laffont, S., Delpy, L., Paulet, PE., Périnat, T., Tschanz, SA., Pelletier, L., Engelhardt, B. and Guéry, JC. (2011) Estrogen receptor α signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*, 187(5), 2386–2393.

Leposavić, G., Karapetrović, B., Obradović, S., Vidić Dandović, B. and Kosec, D. (1996) Differential effects of gonadectomy on the thymocyte phenotypic profile in male and female rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 54(1), 269–276.

Lerner, LJ. & Jordan, VC. (1990) Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. *Cancer research*, 50(14), 4177–4189.

Li, J. & McMurray, RW. (2007) Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on autoimmune disease in lupus-prone NZB/NZW F1 mouse model. *Clinical Immunology*, 123(2), 219–226.

Liu, H., Loo, KK., Palaszynski, K., Ashouri, J., Lubahn, DB. and Voskuhl, RR. (2003) Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *Journal of immunology*, 171(12), 6936–6940.

Liu, W., Putnam, AL., Xu-Yu, Z., Szot, GL., Lee, MR., Zhu, S., Gottlieb, PA., Kapranov, P., Gingeras, TR., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, DM., Xiegler, SF. and Bluestone, JA. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*, 203(7), 1701–1711.

Lösel, R. & Wehling, M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 46–55.

Lyytinen, H. & Ylikorkala, O. (2011) Vaihdevuosi-iän hormonihoido ja rintasyöpäriski: uutta tietoa Suomesta. *Duodecim*, 127(3), 235–242.

- Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583(24), 3966–3973.
- Martinez, FO. & Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(13).
- McMurray, RW., Ndebele, K., Hardy, KJ., & Jenkins, JK. (2001) 17- β -estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine*, 14(6), 324–333.
- Menk, AV, Scharping, NE., Moreci, RS., Zeng, X., Guy, C., Salvatore, S., bae, H., Xie, J., Young, HA., Wendell, SG. and Delgoffe, GM. (2018) Early TCR signaling induces rapid aerobic glycolysis enabling distinct acute T cell effector functions. *Cell reports*, 22(6), 1509–1521.
- Mohammad, I., Starskaia, I., Nagy, T., Guo, J., Yatkin, E., Väänänen, K., watford, WT. and Chen, Z. (2018) Estrogen receptor α contributes to T cell-mediated autoimmune inflammation by promoting T cell activation and proliferation. *Science signaling*, 11(526), p9415.
- Mosmann, TR., Cherwinski, H., Bond, MW., Giedlin, MA. and Coffman, RL. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology*, 136(7), 2348–2357.
- Moulton, VR. (2018) Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease. *Frontiers in Immunology*, 9, 2279.
- Moulton, VR., Holcomb, DR., Zajdel, MC. and Tsokos, GC. (2012) Estrogen upregulates cyclic AMP response element modulator α expression and downregulates interleukin-2 production by human T lymphocytes. *Molecular Medicine*, 18(3), 370–378.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. and Gustafsson, JÅ. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535–1565.
- Noda-Seino, H., Sawada, K., Hayakawa, J., Ohyagi-Hara, C., Mabuchi, S., Takahashi, K., Nishio, Y., Sakata, M., Kurachi, H. and Kimura, T. (2013) Estradiol and raloxifene induce the proliferation of osteoblasts through G-protein-coupled receptor GPR30. *Journal of Endocrinological Investigation*, 36(1), 21–27.
- Norman, AW. & Henry, HL. (2015) Chapter 13 - Estrogens and progestins. Teoksessa A. W. Norman & H. L. Henry (Toim.), *Hormones* (kolmas painos, ss. 275–296).
- Parel, Y. & Chizzolini, C. (2004) CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity Reviews*, 3(3), 215–220.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, JA. and Minutolo, F. (2014) Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, 90, 13–29.
- Pawelec, G., Borowitz, A., Krammer, PH. and Wernet, P. (1982) Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. *European*

Journal of Immunology, 12(5), 387–392.

Phiel, KL., Henderson, RA., Adelman, SJ. and Elloso, MM. (2005) Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunology Letters*, 97(1), 107–113.

Piccinni, MP., Beloni, L., Livi, C., Maggi, E., Scarselli, G. and Romagnani, S. (1998) Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*, 4(9), 1020–1024.

Polanczyk, MJ., Carson, BD., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandembark, AA., Ziegler, SF. and Offner, H. (2004) Cutting edge: Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *The Journal of Immunology*, 173(4), 2227–2230.

Polanczyk, MJ., Hopke, C., Vandembark, AA. and Offner, H. (2006) Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *Journal of Neuroscience Research*, 84(2), 370–378.

Polari, L., Anttila, S., Helenius, T., Wiklund, A., Linnanen, T., Toivola, DM. and Määttä, J. (2019) Novel selective estrogen receptor modulator ameliorates murine colitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12).

Polari, L., Wiklund, A., Sousa, S., Kangas, L., Linnanen, T., Härkönen, P. and Määttä, J. (2018) SERMs promote anti-inflammatory signaling and phenotype of CD14+ cells. *Inflammation*, 41(4), 1157–1171.

Pozzilli, C., De Giglio, L., Barletta, VT., Marinelli, F., Angelis, F. De, Gallo, V., Paganano, VA., Marini, S., Piattella, MC., Tomassini, V. and Pantano, P. (2015) Oral contraceptives combined with interferon β in multiple sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 2(4), 120.

Prieto, GA. & Rosenstein, Y. (2006) Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology*, 118(1), 58–65.

Priyanka, HP., Krishnan, HC., Singh, R. V., Hima, L. and ThyagaRajan, S. (2013) Estrogen modulates in vitro T cell responses in a concentration- and receptor-dependent manner: Effects on intracellular molecular targets and antioxidant enzymes. *Molecular Immunology*, 56(4), 328–339.

Pung, OJ., Tucker, AN., Vore, SJ. and Luster, MI. (1985) Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. *Infection and immunity*, 50(1), 91–96.

Rampersad, SN. (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347–12360.

Revankar, CM., Cimino, DF., Sklar, LA., Arterburn, JB. and Prossnitz, ER. (2005) A

transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307(5715), 1625–1630.

Rider, V., Li, X., Peterson, G., Dawson, J., Kimler, B. F. and Abdou, NI. (2006) Differential expression of estrogen receptors in women with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 33(6), 1093–1101.

Rijhsinghani, AG., Thompson, K., Bhatia, SK. and Waldschmidt, TJ. (1996) Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *American Journal of Reproductive Immunology*, 36(5), 269–277.

Rossouw, JE., Anderson, GL., Prentice, RL., LaCroix, AZ., Kooperberg, C., Stefanick, ML., Jackson, RD., Beresford, SA., Howard, BV., Johnson, KC., Kotchen, JM., Ockene, J. and Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3), 321–333.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*, 155(3), 1151–1164.

Sakaguchi, Shimon, Miyara, M., Costantino, CM. and Hafler, DA. (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 490–500.

Savino, W., Mendes-da-Cruz, DA., Lepletier, A. and Dardenne, M. (2016) Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(2), 77–89.

Schumacher, A. & Zenclussen, AC. (2014) Regulatory T cells: Regulators of life. *American Journal of Reproductive Immunology*, Vsk. 72, ss. 158–170.

Scott, Janine A. Camara, CC. and Early, JE. (1999) Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator. *American Family Physician*, 60(4), 1131–1138. Noudettu osoitteesta

Scottish Cancer Trials Office MRC. (1987) Adjuvant Tamoxifen in the management of operable breast cancer: The Scottish trial: Report from the Breast Cancer Trials Committee, Scottish Cancer Trials Office (MRC), Edinburgh. *The Lancet*, 330(8552), 171–175.

Siiteri, PK. & MacDonald, PC. (1966) Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(7), 751–761.

Simpson, E. (2003) Sources of estrogen and their importance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3–5), 225–230.

Smith-Garvin, JE., Koretzky, GA. and Jordan, MS. (2009) T cell activation. *Annual review of immunology*, 27, 591–619.

- Smith, EP., Specker, B., Bachrach, BE., Kimbro, KS., Li, XJ., Young, MF., Fedarko, NS., Abuzzahab, MJ., Frank, GR., Cohen, RM., Lubahn, DB. and Korach, KS. (2008) Impact on bone of an estrogen receptor-alpha gene loss of function mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(8), 3088–3096.
- Sojka, DK., Bruniquel, D., Schwartz, RH. and Singh, NJ. (2004) IL-2 secretion by CD4 + T Cells *in vivo* is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *The Journal of Immunology*, 172(10), 6136–6143.
- Stanczyk, FF. (2000) Chapter 29 - Estrogens: Different Types and Properties. Teoksessa R. A. Lobo, J. Kelsey, & R. Marcus (toim.), *Menopause Biology and pathobiology* (ss. 421–428).
- Steinman, L. (2007) A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*, 13(2), 139–145.
- Straub, RH. (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews*, 28(5), 521–574.
- Strauss, JF. & FitzGerald, GA. (2019) Steroid hormones and other lipid molecules involved in human reproduction. Teoksessa *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology* (ss. 75-114).
- Szwejsjer, E., Maciuszek, M., Casanova-Nakayama, A., Segner, H. and Verburg-van Kemenade, BML. (2017) A role for multiple estrogen receptors in immune regulation of common carp. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 61–72.
- Tai, P., Wang, J., Jin, H., Song, X., Yan, J., Kang, Y., Zhao, L., An, X., Du, X., Chen, X., Wang, S., Xia, G. and Wang, B. (2008) Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *Journal of Cellular Physiology*, 214(2), 456–464.
- Takagi, Y., Du, J., Ma, XY., Nakashima, I. and Nagase, F. (2004) Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Protects Jurkat Cells from Methylglyoxal-Induced Apoptosis by Preventing c-Jun N-Terminal Kinase-Mediated Leakage of Cytochrome c in an Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Manner. *Molecular Pharmacology*, 65(3), 778–787.
- Tan, IJ., Peeva, E. and Zandman-Goddard, G. (2015) Hormonal modulation of the immune system — A spotlight on the role of progestogens. *Autoimmunity Reviews*, 14(6), 536–542.
- Tan, SL., Monteiro, M., Agua-Doce, A., Azevedo, RI., Lacerda, JF. and Graca, L. (2016) Regulatory T cells: Translational immunology: Mechanisms and pharmacologic approaches. *Translational Immunology*, 205–246.
- Teles, A., Zenclussen, AC. and Schumacher, A. (2013) Regulatory T cells are baby's best friends. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69(4), 331–339.
- Thomas, C. & Gustafsson, JÅ. (2011) The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 597-608.
- Trzonkowski, P., Myśliwska, J., Łukaszuk, K., Szmit, E., Bryl, E. and Myśliwski, A.

- (2001) Luteal phase of the menstrual cycle in young healthy women is associated with decline in interleukin 2 levels. *Hormone and Metabolic Research*, 33(6), 348–353.
- van der Burg, B., Rutteman, GR., Blankenstein, MA., de Laat, SW. and van Zoelen, EJJ. (1988) Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: Synergistic action of insulin and estrogen. *Journal of Cellular Physiology*, 134(1), 101–108.
- Vander Heiden, MG., Cantley, LC. and Thompson, CB. (2009) Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.
- Villa, A., Rizzi, N., Vegeto, E., Ciana, P. and Maggi, A. (2015) Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Scientific Reports*, 5.
- Voskuhl, RR., Wang, H., Wu, TCJ., Sicotte, NL., Nakamura, K., Kurth, F., et al. (2016) Estradiol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, 15(1), 35–46.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S. and Marc, J. (2014) The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Medica*, 24(3), 329–371.
- Watts, C., West, MA. and Zaru, R. (2010) TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 22(1), 124–130.
- Wei, LL., Gonzalez-Aller, C., Wood, WM., Miller, LA. and Horwitz, KB. (1990) 5'-heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Molecular Endocrinology*, 4(12), 1833–1840.
- Whitmire, JK., Asano, MS., Kaech, SM., Sarkar, S., Hannum, LG., Shlomchik, MJ. and Ahmed, R. (2009) Requirement of B cells for generating CD4+ T cell memory. *Journal of immunology*, 182(4), 1868–1876.
- Wiklund, A. (2018) *Selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit T-soluvasteiden säätelyssä*. Pro gradu -työ. Turun yliopisto.
- Wing, JB. & Sakaguchi, S. (2019) Regulatory immune cells. *Clinical Immunology*, 261-271.
- Wu, WM., Suen, JL., Lin, BF. and Chiang, BL. (2000) Tamoxifen alleviates disease severity and decreases double negative T cells in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *Immunology*, 100(1), 110–118.
- Maximov, PY., Lee, TM. and Jordan, VC. (2013) The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Current Clinical Pharmacology*, 8(2), 135–155.
- Yonekura, S., Itoh, M., Shiratori, E., Ohtaka, M. and Tohda, S. (2018) FOXP3 knockdown inhibits the proliferation and reduces NOTCH1 expression of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Research Notes*, 11(1), 582.

Yu, N., Li, X., Song, W., Li, D., Yu, D., Zeng, X., Li, M., Leng, X. and Li, X. (2012) CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T cells: A more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation*, 35(6), 1773–1780.

Zhu, J., Yamane, H. and Paul, WE. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 445–489.

Zirilli, L., Rochira, V., Diazzi, C., Caffagni, G. and Carani, C. (2008) Human models of aromatase deficiency. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3–5), 212–218.

Zoller, AL., Kersh, GJ., Suda, T. and Zlotnik, A. (2006) Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *Journal of immunology*, 176(12), 7371–7378.

LIITE 1

Solujen pintaproteiinien vasta-ainevärjäys virtausytometriaa varten (mukautettu BioLegendin protokollasta):

Työskentely jäällä

1. Valmista kutakin värjättävää kaivoa kohti 50 µl vasta-aineliuosta, jossa:
 - 0,5 µl jokaista vasta-ainetta ja
 - suodatettu PBS / 0,5 % FBS
2. Sentrifugoi levyä 1000 rpm, 5 min ja poista supernatantti.
3. Lisää vasta-aineliuosta 50 µl kuhunkin värjättävään kaivoon. Värjäämättömille kaivoille 50 µl PBS.
4. Inkuboi levyä jäällä 1h valolta suojattuna.
5. Sentrifugoi kuten kohdassa 2.
6. Jatka solunsisäiseen värjäykseen TAI
7. Resuspendoi solut 250 µl PBS ja analysoi virtausytometrillä.

Intrasellulaarisen FOXP3:n värjäminen (mukautettu BioLegendin protokollasta):

1. Valmista Transcription Factor Fix ja Perm -liuosten laimennokset True-Nuclear™ Human Treg Flow™ -kitin (BioLegend) ohjeen mukaan.
2. Lisää 50 µl Transcription Factor 1× Fix -liuosta jokaiseen kaivoon, vorteksoi ja inkuboi valolta suojattuna 45–60 min, RT.
3. Ilman pesua, lisää 100 µl Transcription Factor 1× Perm Buffer -liuosta jokaiseen kaivoon.
4. Sentrifugoi levyä 400 ×g, 5 min, RT ja poista supernatantti.
5. Resuspendoi solut 100 µl Transcription Factor 1× Perm Buffer -liuosta.
6. Lisää 0,5 µl FOXP3-vasta-ainetta per kaivo (paitsi värjäämättömään kontrolliin) ja inkuboi levyä valolta suojattuna ainakin 30 min, RT.
7. Lisää 100 µl Transcription Factor 1× Perm Buffer -liuosta jokaiseen kaivoon.
8. Sentrifugoi levyä 400 ×g, 5 min ja poista supernatantti.
9. Lisää 100 µl suodatettua PBS:ää jokaiseen kaivoon.
10. Sentrifugoi levyä 400 ×g, 5 min ja poista supernatantti.
11. Resuspendoi solut 230 µl:aan suodatettua PBS:ää ja analysoi virtausytometrillä.

Ennen virtausytometrille menoa suodata solut 35 µm membraanin läpi.

LIITE 2

cDNA-synteesissa käytetty master mix

Komponentti	Tilavuus (μ l) / reaktio
10 \times RT Buffer	2.0
25 \times dNTP Mix (100 mM)	0.8
10 \times RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
2 \times RT master mix total	5.8
Nukleaasivapaa H ₂ O RNA	} 14.2
Yhteensä	20.0

Käänteistranskriptaasiketjureaktion ohjelma

	Vaihe 1	Vaihe 2	Vaihe 3	Vaihe 4
Lämpötila (°C)	25	37	85	4
Aika	10 min	120 min	5 min	∞

LIITE 3

Reaktioliuoksen valmistus TaqMan® Universal Master Mix II -protokollan mukaisesti (Applied Biosystems).

Komponentti	Tilavuus (µl) per reaktio	Lopullinen konsentraatio
TaqMan® Universal Master Mix II (2×)	10,0	1×
TaqMan® Gene Expression Assay (20×)	1,0	1×
1:10 -laimennettu cDNA-templaatti + H ₂ O	9,0	8 ng
Yhteensä	20,0	-

qPCR-määrityksessä käytetty ohjelma, yhteensä 40 sykliä. Ensimmäinen sykli vaiheet 1 – 3, loput 39 sykliä vaiheet 2 – 3.

	Vaihe 1	Vaihe 2	Vaihe 3
Lämpötila (°C)	95	95	60
Aika	10 min	15 s	1 min

LIITE 4

TaqMan alukkeet

Geenin nimi	Geenin symboli	Tuotenumero
Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi	GAPDH	Hs02758991_g1
Beeta-aktiini	ACTB	HS99999903_M1
Eukaryootti 18S ribosomaalinen RNA	18S	Hs99999901_s1
Interferoni- γ	IFN γ	Hs00989291_m1
Forkhead Box P3	FOXP3	Hs01085834_m1
Interleukiini-1 β	IL-1 β	Hs01555410_m1
Interleukiini-2	IL-2	Hs00174114_m1
Interleukiini-4	IL-4	Hs00174122_m1
Interleukiini-5	IL-5	Hs00174200_m1
Interleukiini-6	IL-6	Hs00985639_m1
Interleukiini-10	IL-10	Hs00961622_m1
Interleukiini-17A	IL-17A	Hs00174383_m1
Transformoiva kasvutekijä- β	TGF β	Hs00998133_m1
Tuumorinekroositekijä- α	TNF α	Hs01113624_g1
Kemokiiniligandi 5 (RANTES)	CCL5	Hs00174575_m1
Progesteronireseptori	PGR	Hs01556702_m1
Estrogeenireseptori- α	ESR1	Hs00174860_m1
Estrogeenireseptori- β	ESR2	Hs00230957_m1
G-proteiinikytketty estrogeenireseptori	GPER	Hs01922715_s1