

Maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen whole mount -värjäys ja immunofenotyypitys hiiren alkionkehityksen aikana

Johanna Suni

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos
Fysiologia ja genetiikka
Helmikuu 2022

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

TURUN YLIOPISTO
Biologian laitos

SUNI, JOHANNA: Maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen immunofenotyypitys ja whole mount -värjäys hiiren alkionkehityksen aikana

Pro gradu -tutkielma, 55 s., 1 liite

Fysiologia ja genetiikka

Helmikuu 2022

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

Nykyaikaisen tiedon mukaan elimistön makrofagit ovat peräisin kolmesta eri lähteestä; alkion ruskuaispussista ja maksasta sekä aikuisen luuytimeistä. Kudoksissa alkioaikaiset makrofagit muodostavat populaatioita alkuperänsä, toiminta ja sijaintinsa mukaan (kudoskohtaiset makrofagit). Alkioaikana maksassa muodostuvat monosyytit kulkeutuvat verenkierron mukana kudoksiin erilaistuen niissä makrofageiksi. Lämpäistäkseen maksan kapillaarit, sinusoidit, monosyyttien pitää läpäistä sinusoidaalisten endoteelisolujen muodostama endoteeli. Sinusoidaalissa endoteelisoluissa on aukkoja, fenestroja, joita peittää Plvap-proteiinista muodostuva kalvo. Pia Rantakarim ryhmän tutkimusten mukaan Plvap-proteiini säätelee monosyyttien kulkeutumista endoteelisolujen läpi alkionkehityksen aikana. Monosyyttien ja sinusoidaalisten endoteelisolujen väliset molekulaariset vuorovaikutukset ovat kuitenkin toistaiseksi tuntemattomia.

Tutkimuksen tarkoituksena oli optimoida maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen, vaskulaaristen endoteelisolujen ja Plvap-proteiinin immunofluoresenssivärjäys whole mount -menetelmällä ja havainnoida sinusoideissa tapahtuvia muutoksia alkionkehityksen aikana. Lisäksi tarkoituksena oli optimoida maksakudoksen käsittely virtaussytometriaan sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyypitystä ja solujen lajittelua varten. Tavoitteena oli selvittää normaalisti Plvap-proteiinia ilmentävien hiirten alkion maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyyppi eri ikäpisteissä Plvap-proteiinin ilmentymisen suhteen virtaussytometrilla ja lajitella sekä kerätä talteen sinusoidaaliset endoteelisolut heterogeenisestä solususpensiosta spesifisten vasta-aineiden avulla.

Tämän Pro gradun -tulokset vahvistavat käsitystä siitä, että Plvap-proteiinin ilmentyminen paikantuu alkion maksassa sinusoidaalisiin endoteelisoluihin. Kaikissa sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa Plvap-proteiinia ei kuitenkaan ilmennetä. Tämä havaittiin kummallakin tutkimuksessa käytetyllä menetelmällä. Whole mount -värjäyksillä varmistuttiin, että endoteelisolumarkkeerien LYVE-1 ja CD31 avulla sinusoidaaliset endoteelisolut pystytään erottelemaan muista maksan soluista.

AVAINSANAT: kudskohtainen makrofagi, sinusoidaalinen endoteelisolu, virtaussytometria, maksa, whole mount -värjäys

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	1
1.1 Hematopoieesi eli verisolujen muodostuminen.....	1
1.1.1 Alkion hematopoieesi	1
1.1.2 Aikuisen hematopoieesi	4
1.2 Makrofagit	5
1.2.1 Makrofagien jako ja tehtävät	5
1.2.2 Makrofagien kehitys	7
1.3 Maksan sinusoidit.....	9
1.3.1 Sinusoidaaliset endoteelisolut.....	10
1.3.2 Sinusoidien kehitys	11
1.3.3 Sinusoidaalisten endoteelisolujen tehtävät	12
1.4 Alkion maksan monosyyttien kulkeutuminen kudoksiin	13
1.4.1 Plvap	13
1.4.2 <i>Plvap</i> -poistogeeniset hiiret	13
1.5 Tutkimuksen tarkoitus	14
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	16
2.1 Hiiret.....	16
2.2 Whole-mount-värjäykset	16
2.2.1 Kudosten keräys ja käsittely	17
2.2.2 Vasta-ainevärjäys	17
2.2.3 Näytteiden kirkastus	18
2.2.4 Kuvaaminen	19
2.3 Virtaussytometria ja lajitteleva virtaussytometria	19
2.3.1 Solujen eristys hiiren alkion maksasta.....	20
2.3.2 Solujen vasta-ainevärjäys	20
2.3.3 RNA:n eristys ja cDNA-synteesi.....	22
3. TULOKSET	23
3.1 Alkion maksan immunofluoresenssivärjäys.....	23
3.1.1 Whole mount -värjäysten optimointi	23
3.1.2 LYVE-1:n ilmentyminen	28
3.1.3 CD31:n ilmentyminen.....	28
3.1.4 <i>Plvap</i> :n ilmentyminen	29
3.2 Alkion maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyypitys	30
3.2.1 Maksakudoksen käsittelyn optimointi virtaussytometriaan.....	30
3.2.3 Virtaussytometrisen analyysiprosessin malli.....	32

3.2.4 LYVE-1 ⁺ ja CD31 ⁺ solujen osuus	33
3.2.5 Plvap:n ilmentyminen LYVE-1 ⁺ CD31 ⁺ soluissa	34
3.3 Sinusoidaalisten endoteelisolujen lajittelu yksisolusekvensointiin	36
3.3.1 Lajittelevan virtausytometrian analyysimalli	36
3.3.2 RNA:n eristys ja cDNA-synteesi	37
4. POHDINTA	39
4.1 Plvap säätelee alkio kautisten monosyyttien kulkua maksan endoteelin läpi	39
4.1.1 Whole mount -värjäykset	40
4.1.2 Virtausytometria ja lajitteleva virtausytometria	42
4.2 Jatkotutkimus	45
4.3 Tutkimuksen merkitys	46
4.4 Yhteenveto	47
LÄHTEET	

1. JOHDANTO

Fagosytoosiin kykenevät syöjäsolut, makrofagit, tunnistettiin ensimmäisen kerran jo yli sata vuotta sitten. Makrofagien merkityksen ymmärtäminen patogeenien aiheuttamissa infektioissa johtivat soluvälitteisen immunitetin ja fagosyyttijärjestelmän (*engl.* Mononuclear Phagocyte System, MPS) tunnistamiseen. Sittemmin makrofageja on tutkittu intensiivisesti ja niiden toiminnasta on opittu lisää. Makrofagien tiedetään osallistuvan fagosytoosin lisäksi esimerkiksi tulehduksen aktivoimiseen ja tulehdusreaktion säätelyyn sekä kudosten kehitykseen organogeneesin aikana (Wynn ym. 2013). Makrofagit kykenevät adaptoitumaan ympäristöönsä ja ne toimivatkin kussakin kudoksessa spesifisesti, vaikuttavat kudoksen normaaliin toimintaan ja ylläpitävät homeostasiaa. Makrofagien muuttunut toiminta kudoksissa liittyy myös moniin eri sairauksiin, joten ne ovat kiinnostava ja tärkeä kohde lääketieteessä sairauksien hoidossa. Siksi makrofagien alkuperän ja toiminnan ymmärtäminen onkin tärkeää.

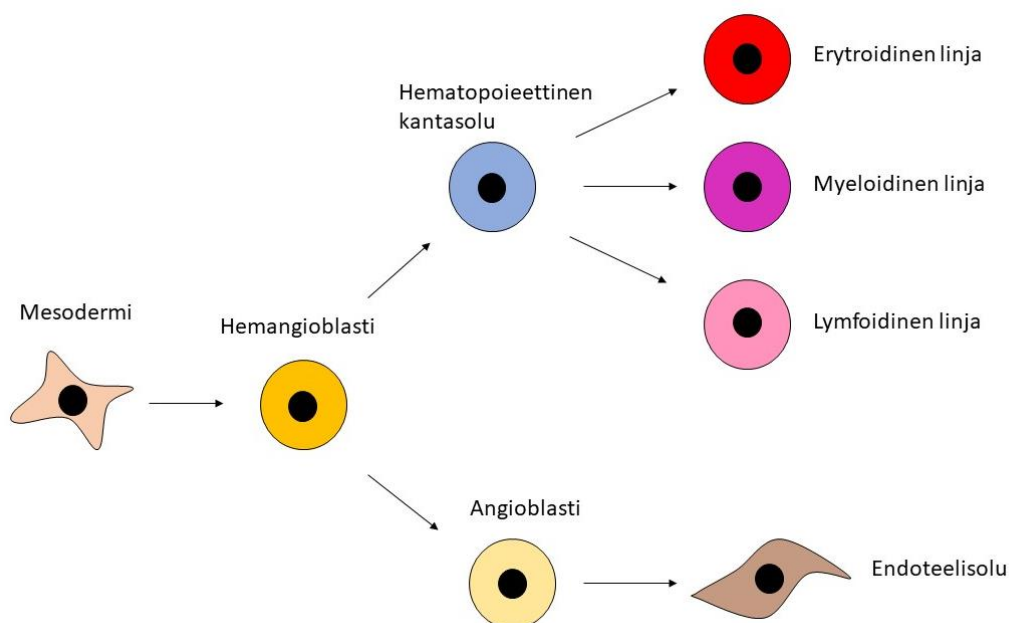
1.1 Hematopoieesi eli verisolujen muodostuminen

Kantasolut ovat erilaistumattomia soluja, jotka voivat jakautua loputtomasti ja muodostaa erilaisia solutyyppejä. Alkion kantasolut ovat joko totipotentteja eli kaikkikykyisiä tai pluripotentteja, jotka voivat erilaistua muiksi kuin istukan tai sikiökalvojen solutyypeiksi. Aikuisen kantasolut ovat multipotentteja, jotka voivat erilaistua muutamiksi eri solutyypeiksi, tai unipotentteja, jotka erilaistuvat vain yhdeksi solutyypiksi. Hematopoieettiset kantasolut ovat multipotentteja kantasoluja, jotka voivat erilaistua eri verisolutyypeiksi. Progenitorisolut eli esisolut ovat varhaisten kantasolujen jälkeläisiä, jotka voivat erilaistua jakautuessaan tietyksi solutyypiksi. Ne eivät voi jakautua kuitenkaan loputtomasti, kuten kantasolut, vaan rajallisen määrän. Kantasoluja ja progenitorisoluja sijaitsee elimistössä uudistuvissa kudoksissa.

1.1.1 Alkion hematopoieesi

Hematopoieettiset kantasolut muodostuvat alkio- ja sikiökaudella useassa eri vaiheessa ja paikassa ennen kuin ne alkavat muodostua luuytimessä syntymän jälkeen. Gastrulaation jälkeen mesodermin solut erilaistuvat hemangioblasteiksi eli multipotentteiksi prekursorisoluiksi, jotka lopulta kehittyvät joko verisuonen

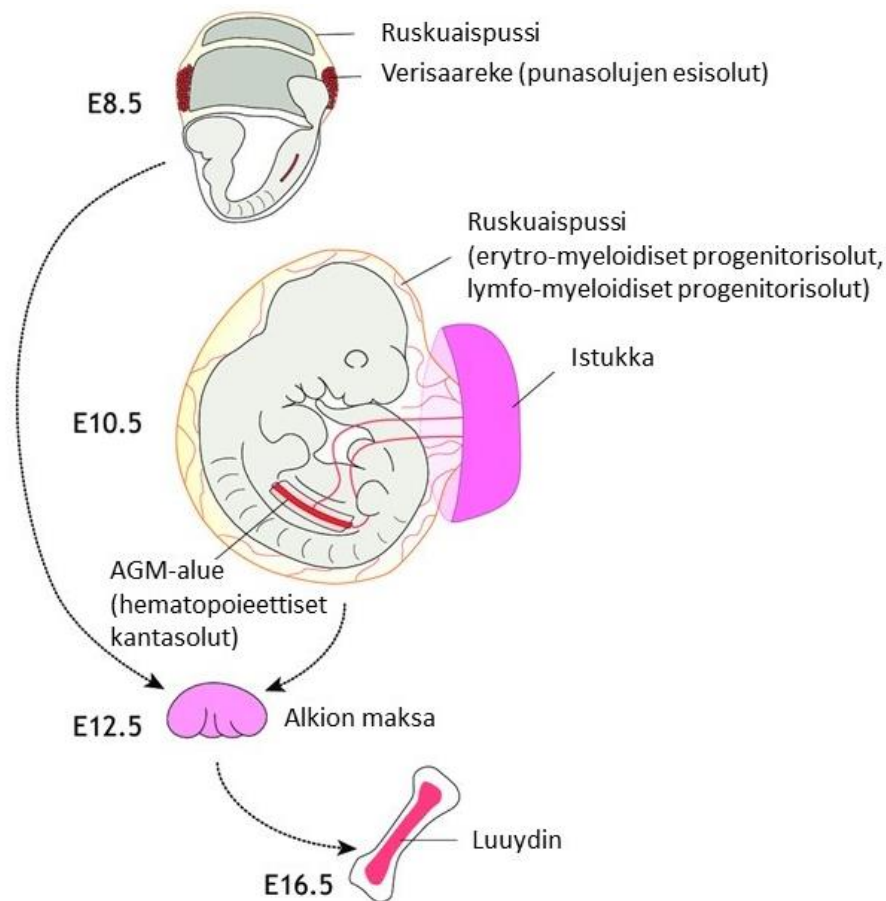
endoteelisoluiksi tai verisoluiksi (kuva 1) (Psaltis ym. 2011). Selkärankaisilla hemangioblastit muodostavat varhaisen alkion ruskuaspussiin verisaarekkeita (*engl.* blood island), joissa alkaa hematopoiesi eli verisolujen muodostuminen (kuva 2). Hiirellä primitiivinen hematopoiesi alkaa alkiopäivänä 7,5, jolloin verisaarekkeissa havaitaan primitiivisiä tumallisia erythroblasteja eli punasolujen prekursorisoluja (Palis ym. 1999, Tober ym 2007). Spesifisen sytokiinistimulaation jälkeen hemangioblastit eriytyvät joko multipotenteiksi hematopoieettisiksi kantasoluiksi (*engl.* hematopoietic stem cells) tai angioblasteiksi (*engl.* angioblast), joista kehittyvät verikapillaarien endoteelisolut (Psaltis ym. 2011). Seuraavassa vaiheessa hiiren alkiopäivänä 8,5 ruskuaispussissa kehittyvät erythro-myeloidiset progenitorisolut (*engl.* erythro-myeloid progenitors), joista kehittyvät lopulta punasolut ja myeloidinen solulinja (Kasaai ym. 2017, Palis ym. 1999). Alkiopäivänä 9,5 ruskuaispussissa ja alkion mesodermin aortaksi kehittyvällä P-Sp-alueella (*engl.* para-aortic splanchnopleura) alkaa kehittymään lymfoidisia progenitorisoluja (Golub & Cumanó 2013).



Kuva 1. Hematopoieettiset kantasolut kehittyvät hemangioblasteista. Alkion mesodermin solut erilaistuvat hemangioblasteiksi, jotka eriytyvät joko hematopoieettisiksi kantasoluiksi tai angioblasteiksi. (Muokattu Psaltis ym. 2011).

Seuraavaksi hematopoieettisia kantasoluja alkaa muodostua alkion aortan seinämän mesenkymaaliosassa eli niin sanotulla AGM-alueella (*engl.* aorta-gonad-mesonephros) alkiopäivänä 10,5 (kuva 2) (Müller ym. 1994). AMG-alueella muodostuneet solut eivät ole kypsiä hematopoieettisia kantasoluja, vaan alkiopäivänä

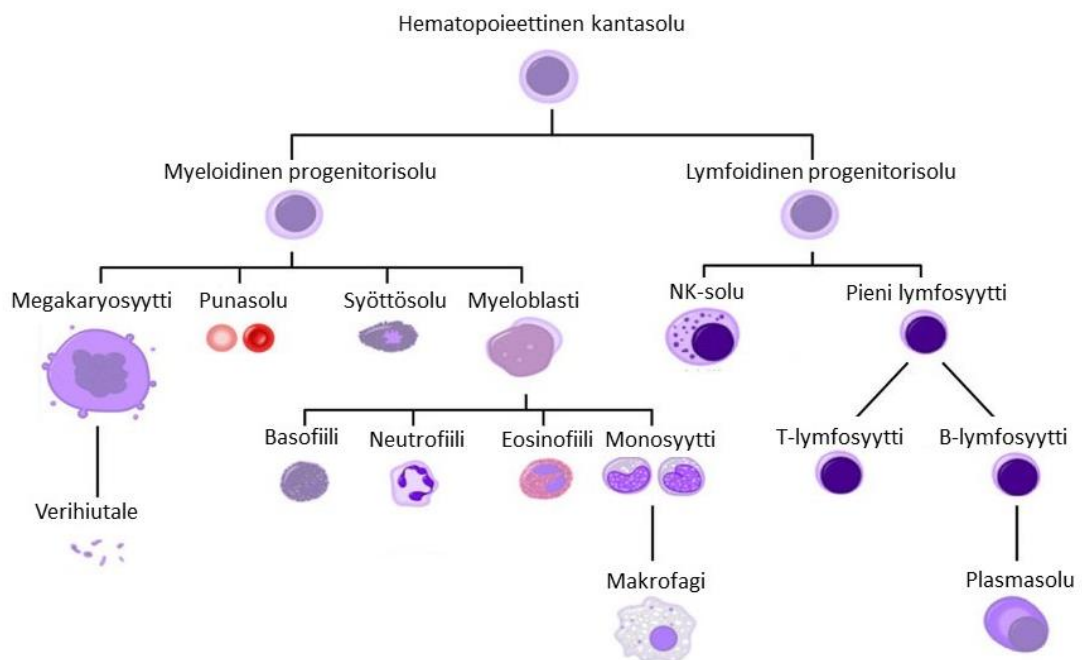
11,5–13,5 ne kulkeutuvat ensin alkion ruskuaispussiin sekä istukkaan ja seuraavaksi maksaan, joissa ne kehittyvät kantasoluiksi (Ema & Nakauchi 2000, Gekas ym. 2005). Myös ruskuaispussista peräisin olevat erytro-myeloidiset progenitorit vaeltavat alkion maksaan ja alkavat erilaistua punasoluiksi ja myeloidisen linjan soluiksi (Gomez Perdiguero ym. 2015). Tässä vaiheessa ruskuaispussista ja aortan seinämän mesenkymaalisesta kudoksesta alkanut alkiokauden hematopoieesi siirtyy suurimmalta osin maksan tehtäväksi (Golub & Cumano 2013). Alkion maksa alkaa tuottaa verisoluja hematopoieettisista kantasoluista ja erytromyeloidisista progenitorisoluista. Alkionkehityksen lopussa hematopoieettisia kantasoluja ja niiden progenitorisoluja vaelttaa maksan lisäksi pernaan, kateenkorvaan ja muihin imukudoksiin.



Kuva 2. Hiiren alkion hematopoieesi. Alkiokauden aikana verisolujen esi- ja kantasolut muodostuvat kolmessa aallossa alkion ruskuaispussissa, ruskuaispussin verisaarekkeissa ja AGM-alueella. Hematopoieettiset kantasolut ja erytromyeloidiset progenitorisolut vaeltavat alkion maksaan, joka on tärkeä hematopoieettinen elin yksilönkehityksen aikana. Syntymän jälkeen hematopoieesi siirtyy luuytimeen. (Muokattu Mevel ym. 2019).

1.1.2 Aikuisen hematopoieesi

Kun maksan hepatoblastit erilaistuvat hepatosyyteiksi, hematopoieesi maksassa vähenee ja siirtyy punaiseen luuytimeen, jossa verisoluja alkaa muodostua alkiopäivänä E16,5 vaeltaneista hematopoieettisista kantasoluista syntymän jälkeen jatkuen yksilön aikuisiän ajan (Lewis ym. 2021). Aikuisella verensolujen muodostuminen tapahtuu siis pääasiassa punaisessa luuytimessä. Lymfosyyttejä ja monosyyttejä siirtyy luuytimestä kypsymään lymfaattiseen järjestelmään, erityisesti pernaan, kateenkorvaan ja imusolmukkeisiin. Syntymän jälkeen punasoluja ja megakaryosyyttejä kypsyy luuytimen lisäksi myös maksassa ja pernassa. Hematopoieettiset kantasolut jakautuvat lymfoidisiin tai myeloidisiin progenitorisoluihin (kuva 3). Lymfoidiset progenitorisolut erilaistuvat lymfoidisiksi prekursorisoluiksi ja edelleen B- tai T-lymfosyyteiksi tai luonnollisiksi tappajasoluiksi eli NK-soluiksi. Myeloidiset progenitorisolut erilaistuvat myeloidisiksi prekursorisoluiksi ja edelleen punasoluiksi, megakaryosyyteiksi tai myeloblasteiksi. Myeloblasteista erilaistuvat monosyytit ja granulosyytit eli basofiilit, neutrofiilit, eosinofiilit ja syöttösolut.










Kuva 3. Aikuisen hematopoieesi. Aikuisella hematopoieesi tapahtuu luuytimessä hematopoieettisista kantasoluista, jotka jakautuvat myeloidiseen ja lymfoidiseen solulinjaan. (Muokattu Juzenas ym. 2017).

1.2 Makrofagit

Elimistön puolustusjärjestelmän toiminta voidaan jakaa synnynnäiseen ja hankittuun eli adaptiiviseen immuunivasteeseen. Hankittu immunitetti perustuu lymfosyyttien toimintaan, jolloin patogeenejä vastaan hyökätään B-solujen tuottamien vasta-aineiden (humoraalinen immunitetti) ja T-solujen (soluvälitteinen immunitetti) avulla. Hankitulle immunitetille on ominaista spesifisyys ja immunologisen muistin muodostuminen patogeenejä vastaan. Synnynnäiseen immuunivasteeseen kuuluvat elimistön fyysiset ja kemialliset esteet ja fagosyyttien sekä erilaisten proteiinien toiminta patogeenejä vastaan. Fagosyytteihin eli syöjäsoluihin kuuluvat neutrofiilit, monosyytit ja monosyyteistä kudoksissa erilaistuvat makrofagit. Synnynnäinen immuunivaste toimii epäspesifisesti eikä muodosta immunologista muistia.

1.2.1 Makrofagien jako ja tehtävät

Makrofagit tunnistavat vieraita soluja pintareseptoreillaan, mikä johtaa fagosytoosiin ja solun tuhoutumiseen. Patogeenien lisäksi makrofagit fagosytoivat kuolleita soluja ja solujätteitä. Makrofagit voivat toimia antigeenejä esittelevinä soluina, sillä aktivoituessaan ne esittelevät MHC-molekyyleissä fagosytoitujen solujen antigeenejä T-lymfosyyteille tehostaen immuunijärjestelmän toimintaa osana hankittua immuunipuolustusta. Makrofagit toimivat immuunipuolustuksen lisäksi kudosten muodostumisessa ja kehityksessä sekä homeostasian ylläpidossa. Makrofagit osallistuvat tulehdusreaktioihin, joten niillä on myös yhteys moniin sairauksiin, esimerkiksi kroonisiin tulehdussairauksiin kuten nivelreumaan, neurodegeneratiivisiin sairauksiin kuten MS-, Alzheimerin ja Parkinsonin tautiin, ateroskleroosiin, diabetekseen, osteoporoosiin ja syöpiin (kuva 4) (Sevenich 2018, Wynn ym. 2013).

Normaali fysiologia		Patologia
Mikroglia (hermoston kehitys, nestetasapaino)		Neurodegeneraatio
Osteoklastit ja makrofagit (luun uusiutuminen; hematopoieesi)		Osteoporoosi/ osteopetroosi Leukemia
Sydän ja verenkierto		Ateroskleroosi
Kupferin solut, (lipidimetabolia, toksien poisto)		Fibroosi
Morfogeneesi		Syöpä ja etäpesäkkeet
Metabolia; rasvasolujen erilaistuminen		Ylipaino ja diabetes
Immuunipuolustus		Reuma, MS-tauti, tulehdukselliset suolistosairaudet

Kuva 4. Makrofagien tehtävät. Makrofagit osallistuvat elinten muodostumiseen, kudosten homeostasiaan ja tulehdusreaktioihin. Makrofagien muuttunut toiminta voi johtaa monien eri sairauksien syntymiseen. (Muokattu Wynn ym. 2013).

Makrofageja esiintyy kaikissa elimistön kudoksissa, joissa ne muodostavat erilaisia solupopulaatioita alkuperänsä, sijaintinsa ja toimintansa mukaan sekä vaikuttavat kudoksen toimintaan. Makrofagit voidaan jakaa tulehduksellisiin makrofageihin ja kudskohtaisiin makrofageihin (*engl.* tissue-resident macrophages). Tulehduksessa luuydinperäiset verenkierrossa kiertävät monosyytit siirtyvät tulehtuneeseen kudokseen aktivointisignaalien vaikutuksesta ja erilaistuvat siellä toiminnallisiksi makrofageiksi. Makrofagit osallistuvat patogeeneiden tuhoamiseen fagosytoosilla ja toimivat antigeeneja esittelevinä soluina. Tulehdukselliset makrofagit toimivat koko tulehdusreaktion ajan ja osallistuvat myös tulehduksen hillitsemiseen, jonka jälkeen ne poistuvat kudoksesta. (Fujiwara & Kobayashi 2005, Oishi & Manabe 2018).

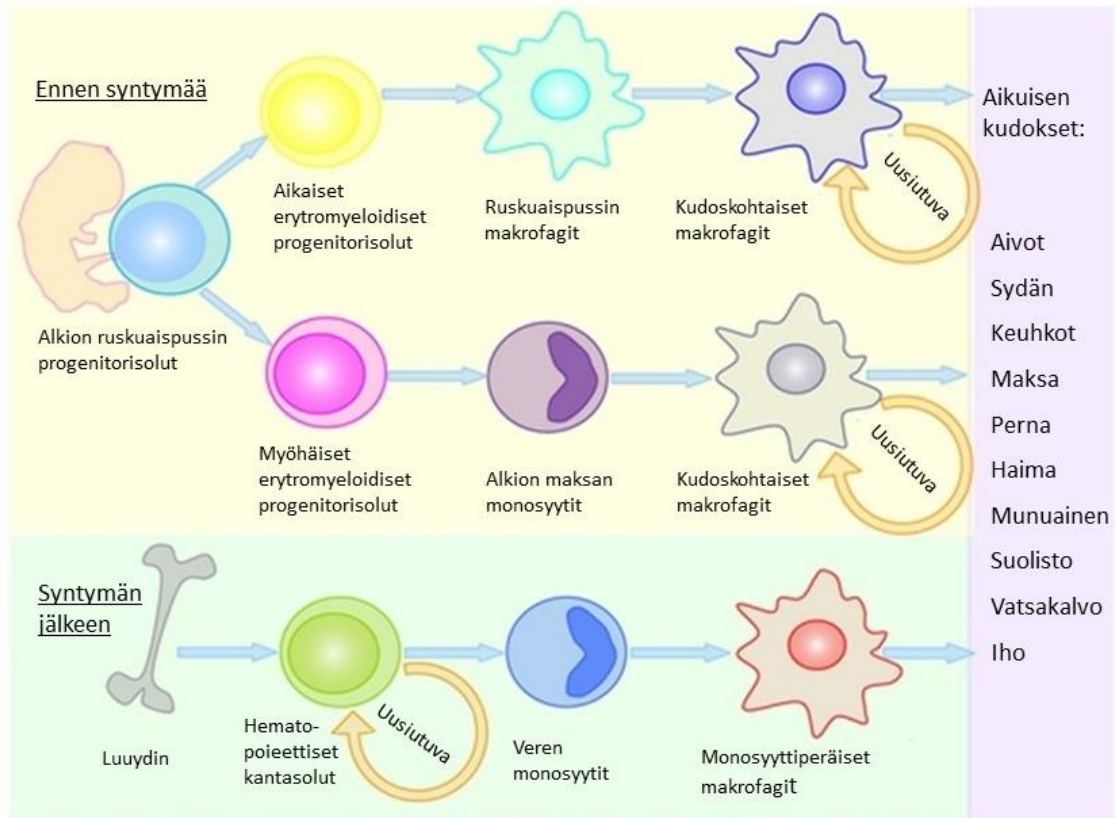
Kudskohtaiset makrofagit ovat hyvin heterogeeninen immuunisolujen populaatio, jotka eroavat toisistaan kudosspesifisen toiminnan mukaan. Kudskohtaiset makrofagit ovat

pääosin peräisin alkionkehityksen ajalta ja ne säilyvät useissa kudoksissa jopa läpi elämän. Niillä on tärkeä rooli kudoksen kehityksessä ja homeostasiassa. Aivojen mikroglia vaikuttavat esimerkiksi hermoston kehittymiseen, ihon Langenhanzin solut ja keuhkojen alveolaariset makrofagit toimivat osana immuunipuolustusta ja maksan Kupfferin solut poistavat verestä mikrobeja. Kudokskohtaiset makrofagit osallistuvat myös kudoksen korjaamiseen vaurion jälkeen. (Gordon & Plüddemann 2017, Wu & Hirschi 2021).

Samassa kudoksessa makrofagit voivat aktivoitua ja polarisoitua eri tavoin riippuen alkuperästä, mikroympäristöstä ja signaaleista, mikä vaikuttaa niiden toiminnalliseen fenotyyppiin (Galli ym. 2011). Karkeasti jaettuna makrofagit jaetaan klassisesti aktivoituviiin M1-soluihin tai vaihtoehtoisesti aktivoituviiin M2-soluihin. Tulehdusta lisäävässä ympäristössä makrofagit polarisoituvat M1-tyyppin soluksi ja erittävät tulehdusta lisääviä sytokiineja toimien syöjäsoluina (Salmi 2017). M2-tyyppin solut puolestaan erittävät tulehdusta hillitseviä sytokiineja sekä kasvutekijöitä uudistaen kudosta ja edistäen kasvainten muodostumista (Salmi 2017).

1.2.2 Makrofagien kehitys

Kudosten homeostasiassa ja immunologiassa merkittävien kudosspesifisten makrofagien alkuperä on edelleen kiistanalainen. Makrofagien uskottiin pitkään erilaistuvan aikuisen verenkierrossa kiertävistä luuytimen kantasoluista peräisin olevista monosyyteistä, jotka erilaistuvat kudoksissa makrofageiksi. On kuitenkin osoitettu, että osa makrofageista on riippumattomia luuytimen hematopoieesista ja monosyyteistä ja suurin osa makrofageista muodostuu jo alkioaikana (Hashimoto ym. 2013). Makrofagit ovat nykytiedon mukaan peräisin kolmesta eri lähteestä: alkion ruskuaispussista, alkion maksasta sekä aikuisen luuytimeistä (kuva 5).



Kuva 5. Makrofagien alkuperä. Ennen syntymää makrofagit ovat peräisin alkion ruskuaispussista sekä maksasta ja ne muodostavat elimiin kudokohtaisia makrofagipopulaatioita, jotka säilyvät läpi elämän aikuisen kudoksissa. Syntymän jälkeen monosyyttejä muodostuu luuytimessä, jotka erilastuvat makrofageiksi kudoksissa tulehduksessa. (Muokattu Fan ym. 2016).

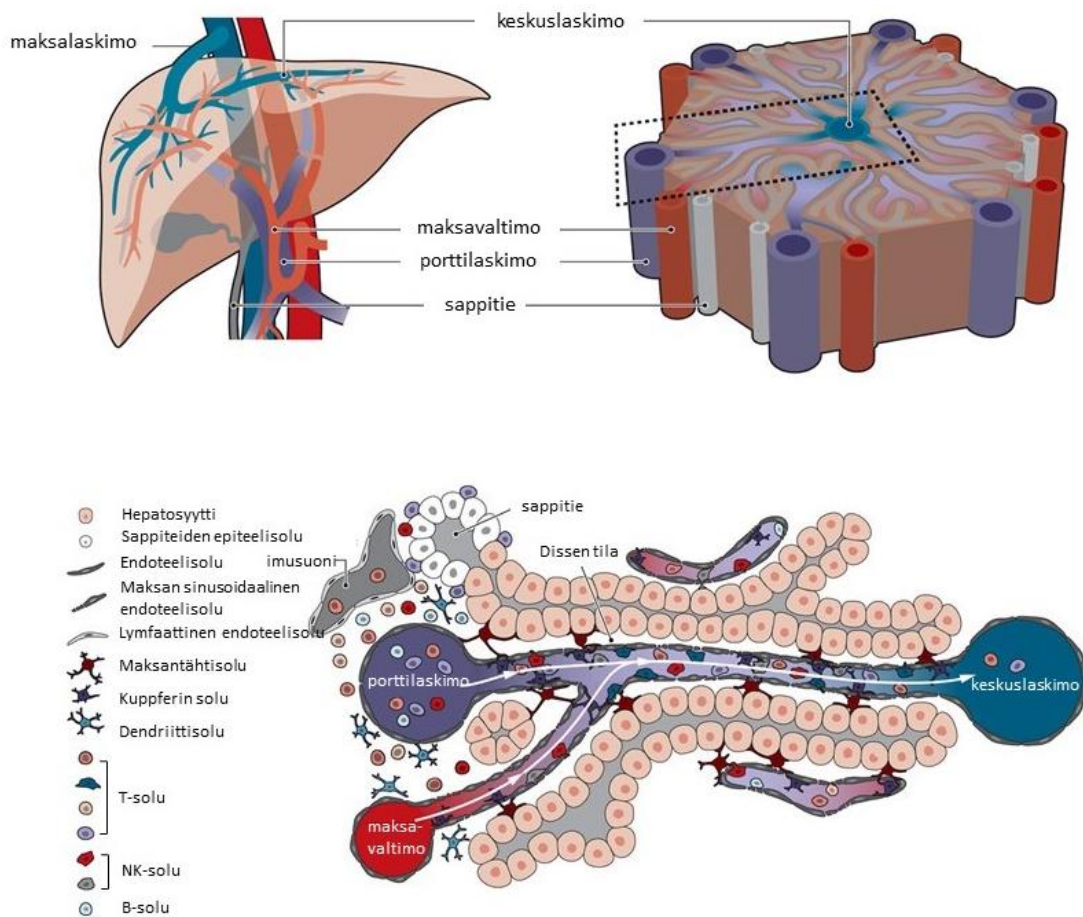
Makrofagien kehitys alkaa alkion ruskuaispussissa alkio päivänä 7,5 progenitorisoluista, jotka erilaistuvat aikaisiksi erytromyeloidisiksi progenitorisoluiksi (*engl.* erythromyeloid progenitors) ja edelleen alkion makrofageiksi (Palis ym. 1999). Ruskuaispussista makrofagit lähtevät verenkierron muodostuessa vaeltamaan alkio päivänä 8,5 alkion kudoksiin, kuten aivoihin, erilaistuen niissä kudokohtaisiksi makrofageiksi (McGrath ym. 2003). Alkio päivänä 8,5 monosyyttejä alkaa muodostua ruskuaispussissa myöhäisistä erytromyeloidisista progenitorisoluista (Gomez Perdiguero ym. 2015). Nämä alkion monosyytit lähtevät toisessa aallossa vaeltamaan verenkierron mukana elimistön kudoksiin, kuten maksaan, organogeneesin alkaessa alkio päivänä 9,5 (Hoeffel ym. 2015). Kudoksissa ne erilaistuvat kudokohtaisiksi makrofageiksi muodostaen populaatioita.

Seuraavaksi alkio päivänä 13,5 monosyyttien tuotanto siirtyy maksaan, jossa niitä tuotetaan ruskuaispussista peräisin olevista progenitorisoluista sekä maksaan vaeltaneista hematopoieettisista kantasoluista (Gomez Perdiguero ym. 2015, Hoeffel ym. 2015).

Maksasta monosyytit vaeltavat verenkierron mukana elimistön kudoksiin, joissa ne erilaistuvat makrofageiksi korvaten kudoksissa osin ruskuaispussista lähtöisin olevat makrofagit (Sheng ym. 2015). Aivojen mikroglia eivät kuitenkaan korvaudu, vaan ovat aikuisellakin ruskuaispussista peräisin olevia makrofageja (Ginhoux ym. 2010). Syntymän jälkeen monosyyttejä aletaan tuottaa hematopoieettisista kantasoluista luuytimessä, josta ne vapautuvat verenkiertoon. Joissakin kudoksissa, kuten suolistossa, alkioperäiset makrofagit korvautuvat luuytimen monosyyteistä erilaistuvista makrofageista (Bain ym. 2014). Alkioaikaista monosyyttien kehittymistä ja liikkumista on tutkittu paljon, mutta niiden kudosspesifistä kulkua ohjaavat molekyylit ovat edelleen tuntemattomia.

1.3 Maksan sinusoidit

Maksa jakautuu viiteen sidekudoksen ympäröimään lohkoon. Keskellä maksaa sijaitsee maksaportti, jota kautta verisuonet, imusuonet ja sappitiehyet kulkevat. Happipitoinen veri tulee maksaan maksavaltimoa pitkin ja vähähappinen veri ruoansulatuskanavasta, pernasta ja haimasta porttilaskimoa pitkin. Porttilaskimon veri sisältää suolesta imeytyneitä ravintoaineita, aineenvaihduntatuotteita ja haitallisia aineita, joita maksa suodattaa verestä pois. Maksakudos koostuu liuskoista, joissa maksasolut eli hepatosyytit ovat järjestäytyneet yhden solukerroksen paksuisiksi palkeiksi. Hepatosyyttien keskellä kulkee laajentunut kapillaarisuoni, sinusoidi (kuva 6). Niitä pitkin veri kulkee porttilaskimon ja maksavaltimon haaroista kohti keskuslaskimoa sekoittuen keskenään.



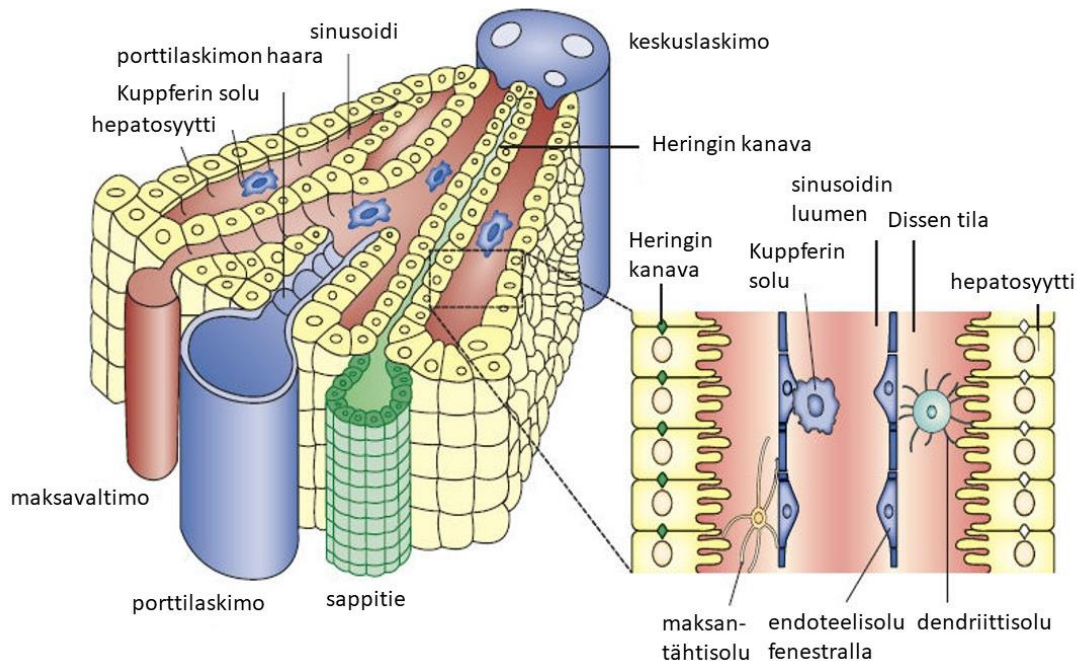
Kuva 6. Maksan rakenne. Maksakudos jakautuu liuskoihin, joiden keskellä kulkee keskuslaskimo. Hepatosyytit ovat järjestäytyneet palkeiksi, joiden keskellä kulkee sinusoidi ja niitä reunustavat endoteelisolut. Veri kulkee porttilaskimon ja maksavaltimon haaroista kohti keskuslaskimoa. (Muokattu Ficht & Iannacone 2020).

1.3.1 Sinusoidaaliset endoteelisolut

Endoteelisolut verhoavat elimistön veri- ja imusuonia yksikerroksisena epiteelinä eli endoteelina. Endoteeli voidaan jakaa yhtenäiseen, aukolliseen ja sinusoidaaliseen sen morfologian perusteella. Yhtenäisen endoteelin endoteelisolujen välissä on tiiviit liitokset. Aukollisen ja sinusoidaalisen endoteelin endoteelisoluissa on puolestaan koko solun paksuisia aukkoja; kaveoleita, fenestroja ja transendotelialaisia kanavia, joita yleensä peittää proteiinista koostuva kalvo (Herrnberger ym. 2012). (Stan 2007).

Maksan sinusoidit ovat hyvin läpäiseviä kapillaarisuonia, sillä niissä ei ole ollenkaan tyvikalvoa, kuten muissa elimistön hiussuonissa. Sinusoidit muodostuvat sinusoidaalisisista endoteelisoluista (*engl.* liver sinusoidal endothelial cell), joiden seassa on erikoistuneita makrofageja, Kupfferin soluja (kuva 7.). Endoteelisolujen ja hepatosyyttien väliin jää niin kutsuttu Dissen tila, jossa tapahtuu veren ja hepatosyyttien

välinen molekyylien vaihto endoteelin aukkojen, fenestrojen, kautta, joita peittää proteiinalvo (kuva 7). Ainoa tunnettu sinusoidaalisten endoteelisolujen fenestroja peittävä proteiini on Plvap (Herrnberger ym. 2012, Stan ym. 1999). Fenestrat mahdollistavat veden ja pienten molekyylien suodattumisen maksan soluihin, mutta estävät veren proteiinien ja verisolujen pääsyn kudokseen. Ensimmäisen kerran maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen väliset fenestrat kuvattiin 1970-luvulla rotan maksasta elektronimikroskoopilla (Wisse 1970). Fenestrojien perusrakenne on kaikilla lajeilla samanlainen, mutta läpimitta ja määrä vaihtelee eri lajeilla sekä myös yksilöiden välillä vasteena erilaisille hormoneille, lääkeaineille, toksineille, sairauksille tai solunulkoisen matriksin muutoksille (Braet & Wisse 2002). Endoteelisolujen ja fenestrojien eheys on välttämätöntä molekyylien vaihdon ylläpitämiseksi veren ja maksasolujen välillä.



Kuva 7. Sinusoidaalisten endoteelisolujen sijainti maksassa. Endoteelisolut vuoraavat sinusoideja yhden solukerroksen paksuisena esteenä. Hepatosyyttien ja endoteelisolujen väliin jää niin kutsuttu Dissen tila, jonka kautta tapahtuu aineiden vaihto veren ja hepatosyyttien välillä. (Muokattu Adams & Eksteen 2006).

1.3.2 Sinusoidien kehitys

Maksa kehittyy gastrulaation jälkeen endodermista eli sisimmästä alkiokerrokseta. Endodermi muodostaa alkusuolen, josta lähtevästä silmusta kehittyy maksasilmu haimasilmun viereen (Zaret & Grompe, 2008). Hepatoblastit eli maksan kantasolut voivat

erilaistua hepatosyyteiksi ja kolangiosyyteiksi eli sappitiehyeiden epiteelisoluiksi (Lemaigre 2009). Maksan kantasolujen alkuperä on epäselvä, mutta vaihtoehtoina on esitetty Heringin kanavien ympärillä sijaitsevia tiehytsoluja tai hepatosyyttejä, jotka ulkoisten signaalien aktivoitumina jakautuvat ja erilaistuvat uusiksi hepatosyyteiksi (Hakonen ym. 2014). Myös maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen alkuperä on vielä osittain kiistanalainen, mutta joidenkin tutkimusten mukaan ne muodostuvat mesenkyymistä osana mesodermia (Couvelard ym. 1996). On myös esitetty todisteita, että ne ovat peräisin endoteeli- ja verisolujen progenitoreista, hemangioblasteista (Zovein ym. 2008). Alkionkehityksen aikana sinusoidaaliset endoteelisolut menettävät solumarkkereita pinnaltaan ja aikuisten endoteelisolumarkkerit lisääntyvät (Couvelard ym. 1996). Tätä sinusoidaalisten endoteelisolujen erilaistumista säätelevät hepatoblastit endoteelikasvutekijä VEGF:n ja solujen välisten vuorovaikutusten avulla (Walter ym. 2014).

1.3.3 Sinusoidaalisten endoteelisolujen tehtävät

Sinusoidaaliset endoteelisolut toimivat läpäisevänä esteenä veren ja hepatosyyttien välillä huolehtien aineiden kuljetuksesta ja suodattamisesta maksassa. Niillä on korkea endosytoosikapasiteetti ja tärkeä tehtävä veren puhdistuksessa, sillä ne poistavat verestä aineenvaihduntatuotteita, vanhentuneita plasman proteiineja, lipoproteiineja, kylomikroneita, viruksia ja lääkeaineita Dissen tilaan (Poisson ym. 2017). Sinusoidaaliset endoteelisolut toimivat myös osana synnynnäistä immuunipuolustus fagosytoiden soluja ja osana hankittua immuunipuolustusta antigeenien esittelyssä. Ne toimivat tarttumisalustana maksan immuunipuolustuksen soluille eli Kupfferin soluille, lymfosyyteille ja dendriittisoluille. Kupfferin solut poistavat verestä isoja molekyylejä, bakteereja ja muita soluja fagosytoosilla. Sinusoidaaliset endoteelisolut säätelevät lisäksi monosyyttien kulkua hepatosyyteistä sinusoideihin ja verenkirron mukana kudoksiin alkionkehityksen aikana.

Sinusoidaalisten endoteelisolujen immunofenotyyppityksellä ja yksisolusekvennoinnista saadulla geenitiedolla niiden tiedetään muodostavan erilaisia populaatioita sen mukaan, sijaitsevatko ne lähellä porttilaskimoa, keskellä sinusoidia vai lähellä keskuslaskimoa ja populaatiot voidaan erotella toisistaan eri antigeenien ilmenemisen perusteella (Su ym. 2021, Xie ym. 2010). Sinusoidaaliset endoteelisolut kykenevät myös uusiutumaan progenitorisoluista esimerkiksi infektioiden tai toksinien aiheuttamasta maksavauriosta

(Wang ym. 2012). Endoteelisoluissa tapahtuvilla muutoksilla on vaikutuksia maksan toimintaan ja niiden toimintahäiriöiden tiedetään altistavan useiden eri maksan sairauksien, kuten maksakirroosin ja -fibroosin, virusinfektioiden ja maksasyövän syntymiselle (Braet & Wisse 2002).

1.4 Alkion maksan monosyyttien kulkeutuminen kudoksiin

Alkiopäivän 13,5 jälkeen alkion monosyytit alkavat vaelttaa maksasta verenkierron mukana kudoksiin muodostaen niissä suurimman osan aikuisen kudokohtaisista makrofagipopulaatioista (Hoeffel ym. 2015). Päästäkseen maksasta verenkiertoon, monosyytit läpäisevät sinusoidaalisten endoteelisolujen muodostaman solukerroksen eli maksan sinusoidien seinämän endoteelisolujen fenestrojen läpi. Ainoa tunnettu fenestroja peittävä proteiini on Plvap (Stan ym. 1999).

1.4.1 Plvap

Plvap (*engl.* Plasmalemma vesicle associated protein) on glykolysoitu transmembraaniproteiini, joka esiintyy endoteelisolujen fenestroissa. Se tunnetaan myös nimillä PV-1, PAL-E ja MECA-32. Maksassa Plvap ohjaa alkioaikaisten monosyyttien liikkumista muodostamalla siivilänkaltaisia kalvoja sinusoidaalisten endoteelisolujen fenestroihin (Auvinen ym. 2019). Kalvon muoto muistuttaa kärrynpyörää, jossa homodimeeriset fibrillit suuntautuvat kohti fenestran keskiosaa (Stan ym. 1999). Fenestrojen biogeneesi on huonosti tunnettu ja niiden muodostumisen on ajateltu olevan Plvap-proteiinista riippuvaista (Herrnberger ym. 2014). Auvinen ym. (2019) ovat kuitenkin osoittaneet, että Plvap ei vaikuta sinusoidien morfologiaan, fenestrojen määrään tai maksan verisuoniston rakenteeseen.

1.4.2 Plvap-poistogeeniset hiiret

Plvap-puutteisilla hiirillä on havaittu alkion maksan monosyyteistä peräisin olevissa makrofagipopulaatioissa merkittäviä puutoksia useissa kudoksissa, kun puolestaan ruskuaispussista ja luuytimeistä peräisin olevat makrofagipopulaatiot esiintyvät normaalisti (Rantakari ym. 2016). Plvap-proteiinin osoitettu ilmentyvän sinusoidaalisten endoteelisolujen fenestroissa, sillä kaveoli-puutteisilla hiirillä ei havaittu muutoksia

alkioperäisten makrofagien määrässä kudoksissa eikä kaveloideiden puuttuminen vaikuttanut Plvap-proteiinin ilmentymiseen (Rantakari ym. 2016). Plvap-proteiinin puuttumisen johdosta sinusoidaalisten endoteelisolujen fenestroihin ei muodostu siivilämäistä kalvoa, joten ne jäävät avoimiksi (Herrnberger ym. 2012). Avoimet fenestrat estävät alkioaikana monosyyttien kulkeutumisen niiden läpi sinusoideihin ja verenkierron mukana kudoksiin.

Makrofagien puutos kudoksissa aiheuttaa häiriöitä elimistön makrofagivälitteisissä toiminnoissa. Esimerkiksi pernan ja maksan makrofagit välittävät normaalisti raudan kierrätykseen liittyviä toimintoja, joten Plvap-puutteisilla hiirillä rautaa kertyy pernaan ja maksaan (Rantakari ym. 2015). Plvap-proteiinin puute lisää verisuonten läpäisevyyttä ja johtaa alle 70 kDa:n kokoisten proteiinien vuotamiseen ulos suonista, mikä aiheuttaa turvotusta, sisäisiä verenvuotoja, veren proteiinien puutoksia ja elinten epämuodostumista alkionkehityksen aikana (Elkadri ym. 2015, Herrnberger ym. 2012, Stan ym. 2012). Homotsygoottiset Plvap-puutteiset hiiret kuolevatkin yleensä jo ennen syntymää tai hyvin nuorina (Herrnberger ym. 2012).

1.5 Tutkimuksen tarkoitus

Alkion maksan sinusoidaalisilla endoteelisoluilla on keskeinen rooli useissa eri kudoksissa esiintyvien kudokskohtaisten makrofagien liikkumisen säätelyssä alkionkehityksen aikana. Maksassa tuotettujen monosyyttien pitää läpäistä sinusoidien endoteelisolukerros päästääkseen verenkierron mukana vaeltamaan kudoksiin. Pia Rantakarin ryhmä on osoittanut, että tätä monosyyttien liikkumista säätelee sinusoidaalisten endoteelisolujen fenestroissa esiintyvä Plvap-proteiini (Rantakari ym. 2016). Plvap-proteiinin siis on oltava vuorovaikutuksissa tiettyjen molekyylien kanssa, jotka säätelevät monosyyttien liikennettä, mutta toistaiseksi nämä vuorovaikutukset sinusoidaalisten endoteelisolujen ja monosyyttien välillä sekä liikkumista säätelevät molekulaariset mekanismit ovat tuntemattomia.

Tämän pro gradu –tutkielman tavoitteena on optimoida maksakudoksen käsittely ja värjäysprotokolla maksan vaskulaaristen ja sinusoidaalisten endoteelisolujen sekä Plvap-proteiinin immunofluoresenssivärjäykseen whole mount -menetelmällä. Värjäyksillä varmistetaan, että käytetyt vasta-aineet sitoutuvat spesifisesti tutkimuskohteena oleviin alkion maksan sinusoidaaliin endoteelisoluihin, jolloin niiden avulla halutut solut voidaan eristää maksan muista soluista. Eri ikäisten alkioiden maksojen

mikroskooppisella kuvantamisella on tavoitteena kuvata sinusoidien kehitystä alkionkehityksen aikana.

Toisena tavoitteena on optimoida maksakudoksen käsittely sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyypitykseen virtaussytometrillä. Fenotyypityksellä selvitetään sinusoidaalisten endoteelisolujen osuus maksan soluista ja Plvap-proteiinia ilmentävien solujen osuus sinusoidaalisista endoteelisoluista. Tarkoituksen on selvittää, muuttuuko Plvap-proteiinia ilmentävien solujen osuus alkionkehityksen aikana Plvap-proteiinia normaalisti ilmentävissä hiirissä.

Kolmantena tavoitteena on optimoida maksakudoksen käsittelyprotokolla sinusoidaalisten endoteelisolujen eristämiseksi heterogeenisestä solususpensiosta lajittelevalla virtaussytometrillä vasta-aineiden avulla. Tarkoituksena on selvittää, kuinka paljon eri ikäisten alkioiden maksoista saadaan lajiteltua sinusoidaalisia endoteelisoluja yksisolusekvensointia varten. Kerätyistä soluista eristetään RNA, mikä käännetään cDNA:ksi ja lähetetään yksisolusekvensoitavaksi tulevaisuudessa analysoitavaa geenidataa varten.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Hiiret

Hiiret ylläpidettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa standardiolosuhteissa (lämpötila 24 °C, ilmankosteus 39 %, 12 tunnin valo-/pimeärytmi). Hiirillä oli jatkuvasti saatavilla ruokaa ja vettä. Eläinkokeet suoritettiin Suomen koe-eläinlautakunnan hyväksymin tavoin (lisenssinumero ESAVI/14685/2020) ja EU-lainsäädännön mukaisesti noudattaen EU-direktiiviä 2010/63/EU.

Töissä käytettiin yleistä sisäsiittoista C57BL/6NRj (6N, Janvier Labs) -hiirikantaa. Hiirialkioiden ikä laskettiin aikaparitusten avulla. Parittelun katsottiin onnistuneen, kun naaraalla havaittiin parittelutulppa aamulla, minkä jälkeen uros ja naaras erotettiin eri häkkeihin. Parittelutulpan havaitsemispäivänä alkioiden ikä on E0,5 (*engl.* E=embryonic day) ja siitä eteenpäin ikä lasketaan vuorokausien mukaan. Poikaset syntyvät 18–20 päivää hedelmöitykseen johtaneen parittelun jälkeen. Kudokset kerättiin hiiren alkioista alkiopäivinä 12,5, 15,5 ja 17,5 sekä vastasyntyneistä poikasista (P0). Hiiriemot lopetettiin hiilidioksidilla ja niskamurrolla. Kohtu kerättiin kylmään PBS-liuokseen ja pidettiin kylmässä 30 minuuttia, jolloin alkiot altistuvat hypotermialle. Sen jälkeen alkiot preparoitiin kohdusta, lopetettiin dekapitaatiolla ja kudokset kerättiin talteen.

2.2 Whole-mount-värjäykset

Whole-mount –tekniikassa vasta-aineilla värjätään haluttuja proteiineja tai muita antigeenejä kudospaloista, kokonaisista kudoksista tai alkioista. Tekniikka eroaa muista immunofluoresenssivärjäyksistä siten, että näytteet ovat paksumpia, jolloin kudoksista saadaan kuvattua kolmiulotteisia rakenteita. Tässä pro gradu -tutkimuksessa tarkoituksena oli paikantaa sinusoidaalisten endoteelisolujen ja Plvap-proteiinin sijainti vasta-aineiden avulla sekä kuvata kolmiulotteisesti ikäsarja kehittyvän alkion maksan sinusoidien rakenteesta. Ennen varsinaisia värjäyksiä kudosten käsittely ja vasta-aineiden käyttöpitoisuudet piti optimoida, sillä niitä ei ollut testattu aiemmin whole mount -värjäyksissä.

2.2.1 Kudosten keräys ja käsittely

Hiiren alkiodien maksat kerättiin 24-kuoppalevyille kylmään PBS-liuokseen. Kudoksia inkuboitii tunnin ajan hepariini-PBS-liuoksessa (1:20) (hepariini LEO 100 IU/ml) tasoravistelijassa huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen näytteet fiksattiin 2 % PFA-PBS-liuoksessa 20 minuutin ajan jäällä. Fiksaation jälkeen näytteet pestiin PBS:llä kolmesti 10 minuutin ajan jäällä. Yleensä näytteistä ei heti valmistettu whole mount-leikkeitä, joten pesujen jälkeen ne dehydroitiin eli vesi poistettiin 50 % metanoli/PBS-liuoksella 30 minuutin ajan ja kahdesti 100 % metanolilla 30 minuutin ajan. Näytteet säilöttiin 100 % metanolissa -20°C :ssa. Säilömisän jälkeen näytteet rehydroitiin eli vesi palautettiin ennen värjäyksiä ensin 50 % metanoli/PBS-liuoksella 30 minuutin ajan ja PBS:llä kahdesti 20 minuutin ajan jäällä. Sen jälkeen näytteet valettiin 4 % agarosigeeliin (Low melting agarose, Lonza) muottiin. Geelin jähmetyttyä näytteistä leikattiin vibratomilla 500 μm :n paksuisia leikkeitä 24-kuoppalevyille PBS:ään.

2.2.2 Vasta-ainevärjäys

Whole mount -värjäyksissä käytettiin epäsuoraa menetelmää eli kudokset käsiteltiin ensin primaarivasta-aineella, joka ei sisällä merkkiainetta. Sen jälkeen kudokset käsiteltiin fluoresoivalla merkkiaineella leimatulla sekundaarisella vasta-aineella, joka tarttuu spesifisesti primaariseen vasta-aineeseen. Työssä käytetyt kudokset värjättiin joko yhdellä tai kahdella vasta-aineella samanaikaisesti. Whole mount -leikkeet värjättiin ensin primaarisilla vasta-aineilla (taulukko 1) ja sen jälkeen sekundaarisilla vasta-aineilla (taulukko 2).

Vasta-ainevärjäykset ja pesut tehtiin 24-kuoppalevyllä 500 μl :n tilavuudessa valolta suojattuna. Antigeenispesifisten vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen estettiin inkuboimalla näytteitä kolme tuntia PBS-Triton-seerumit-liuoksessa (1 % NGS + 0,5 % FCS + 1 % BSA + 0,4 % Triton PBS-liuoksessa) $+4^{\circ}\text{C}$:ssa tasoravistelijassa. Näytteet värjättiin ensin yhdellä tai kahdella primaarisella vasta-aineella (taulukko 1) yön yli $+4^{\circ}\text{C}$:ssa tasoravistelijassa. Seuraavana päivänä sitoutumaton vasta-aine pestiin pois 3-6 tunnin ajan PBS-BSA-T-liuoksessa $+4^{\circ}\text{C}$:ssa tasoravistelijassa ja pesuliuos vaihdettiin tuoreeseen kahdesti pesun aikana. Primaarivasta-aineen ja pesujen jälkeen näytteet värjättiin yhdellä tai kahdella sekundaarisella vasta-aineella (taulukko 2) yön yli $+4^{\circ}\text{C}$:ssa tasoravistelijassa ja seuraavana päivänä sitoutumaton vasta-aine pestiin pois 3-6

tunnin ajan PBS-BSA-T-liuoksessa +4 °C:ssa tasoravistelijassa. Seerumit pestiin pois kolme kertaa 20 minuutin ajan 0,4 % Triton -PBS-liuoksella. Näytteistä poistettiin vesi pitämällä niitä jäillä 20 minuuttia 50 % metanolissa ja kaksi kertaa 10 minuuttia 100 % metanolissa. Kontrollileikkeet käsiteltiin kuten edellä, mutta ne värjättiin ainoastaan sekundaarivasta-aineilla. Lopuksi näytteiden ympäriltä poistettiin agarooosi pinsettien ja saksien avulla.

Taulukko 1. Whole mount -värjäyksissä käytetyt primaariset vasta-aineet.

Antigeeni	Isäntäeläin	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennossuhde	Eränumero
LYVE-1	Kani	ReliaTech, GmbH 103-PA50	1:50	1410R09-1
MECA-32	Rotta	Bio X Cell, BE0200	1:300	5507/1214
CD31	Rotta	BD Pharmingen, 553370	1:100	6196687

Taulukko 2. Whole mount -värjäyksissä käytetyt sekundaariset vasta-aineet.

Fluorokromi	Isäntäeläin	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennossuhde	Eränumero
Alexa Fluor A488	Vuohi-anti- rotta	Life technologies, A11006	1:500	A11006
Alexa fluor A647	Vuohi-anti- kani	Invitrogen, A27040	1:500	RK239132A

2.2.3 Näytteiden kirkastus

Kuvaamista varten näytteet kirkastettiin 50 % ja 100 % bentsyylialkoholi-bentsyylibentsoaattiliuoksella (BABB). 100 % BABB-liuos valmistettiin yhdistämällä yksi osa bentsyylialkoholia (Sigma-Aldrich) ja kaksi osaa bentsyylibentsoaattia (Sigma-Aldrich). 50 % BABB-liuos valmistettiin yhdistämällä yksi osa 100 % BABB-liuosta ja yksi osa 100 % metanolia. Kirkastus tehtiin 100 µl:n tilavuudessa lasipohjaisissa petrimaljoissa, joissa näytteitä pidettiin ensin 50 % BABB-liuoksessa kerralla 10–20 minuuttia ja liuos vaihdettiin kerran uuteen. 100 % BABB-liuoksessa näytteitä pidettiin kerralla 10–20 minuuttia ja uusi liuos vaihdettiin 2–4 kertaa, kunnes näyte oli kirkastunut.

Lopuksi näytteet jätettiin 100 % BABB-liuokseen (120 μ l), peitettiin peitinlasilla ja säilytettiin +4°C:ssa valolta suojattuna kuvaamiseen asti.

2.2.4 Kuvaaminen

Näytteet kuvattiin 3i Marianas CSU-W1 spinning disk konfokaalimikroskoopilla 40x/1.1 vesiobjektiivilla ja SlideBook 6 -ohjelmalla (Intelligent Imaging Innovations). Kuvat analysoitiin Fiji-kuvanmuokkausohjelmalla. Konfokaalimikroskopian etuna fluoresenssimikroskopiaan on terävämpi ja tarkempi kuva. Yksittäisen apertuurin (*engl.* pinhole) sijaan spinning disk konfokaalimikroskoopissa on satoja apertuureja spiraalimaisessa muodossa nopeasti pyörivässä levyssä. Reikien avulla näyte skannataan riveittäin ja siitä muodostuu kuva. Muuttamalla levyn pyörimisnopeutta, reikien halkaisijaa tai etäisyyttä toisistaan voidaan optimoida kuvan kirkkautta, kontrastia ja laatua. Valonlähteenä on laservalo, jonka objektiivi kohdistaa diffraktiorajoitettuun pisteeseen näytteessä tietyssä syvyystasossa. Näytettä tarkastellaan siis leikkeinä eri syvyystasoissa. Näytteestä emittoituvat fotonit ohjataan objektiivin läpi apertuurin kautta ilmaisimelle. Tarkennetun pisteen ylä- ja alapuolelta tuleva valo ei pääse apertuuriin, joten kuvasta saadaan terävä. Spinning disk mikroskoopilla pystytään kuvaamaan tehokkaasti tarkkoja kolmiulotteisia kuvia kudoksesta ja sen rakenteista.

2.3 Virtausytometria ja lajitleva virtausytometria

Virtausytometrialla voidaan selvittää erilaisten solutyypin ja -populaatioiden määrää kudoksessa. Virtausytometriassa hyödynnetään solujen fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia, joita havainnoidaan fluoresoivilla väriaineilla, fluoresoivalla aineella konjugoiduilla vasta-aineilla tai transfektoimalla soluihin fluoresoivia proteiineja. Solususpensio imetään virtauskammioon, jossa paineistettu ajoliuos pakottaa näyteliuoksessa olevat solut kulkemaan yksitellen jonossa laservalon ohi (nk. hydrodynaaminen fokusointi). Soluista sironnut laservalo sekä virittyneestä merkkiaineesta sironnut fluoresenssi ohjataan optisten peilien ja suotimien avulla suorasironta-, sivusironta- ja fluoresenssi-ilmaisimille. Ilmaisimien keräämän datan perusteella solut erotellaan toisistaan koon (suorasironta), granulaisuuden (sivusironta) ja antigeeneihin sitoutuvien vasta-aineiden (fluoresenssi) avulla. Tässä tutkimuksessa virtausytometrialla karakterisoitiin eri ikäisten hiiren alkioiden maksan sinusoidaalisten

endoteelisolujen fenotyyppejä spesifisten endoteelisolumarkkereiden LYVE-1 ja CD31 avulla. Lisäksi tarkoituksena oli määrittää Pivap-proteiinia (MECA-32) ilmentävien solujen määrä sinusoidaalista endoteelisoluista.

Lajittelevalla virtaussytometrilla voidaan elektrostaattisesti lajitella ja kerätä talteen heterogeenisestä yksisolususpensiosta eri solupopulaatiot. Soluvirta hajotetaan pisaroiksi ja jokainen pisara sisältää yhden solun, joka voidaan varauksen avulla lajitella ja ohjata keräysputkeen. Tässä tutkimuksessa tarkoituksena oli lajitella ja kerätä talteen hiiren alkion sinusoidaaliset endoteelisolut (LYVE-1⁺ CD31⁻, LYVE-1⁺ CD31⁺ solut) muista maksan soluista ja kerättiin talteen yksisolusekvenssintia varten.

2.3.1 Solujen eristys hiiren alkion maksasta

Hiiren alkioden maksat preparoitiin 24-kuoppalevyille kylmään RPMI-1640 mediumiin (Sigma-Aldrich), minkä jälkeen maksakudos pilkottiin pieniksi paloiksi saksilla ja kudospalat hajotettiin solususpensioksi pipetoimalla niitä edes takaisin. Mekaanisen hajotuksen jälkeen kudos hajotettiin entsyymaattisesti kollagenaasi D:llä (1 mg/ml, Roche) ja DNAasi I:llä (50 µg/ml, Roche) tunnin ajan 37 °C:ssa tasoravistelijassa. Inkuboinnin puolella välissä solususpensiota sekoitettiin pipetoimalla edes takaisin. Inkuboinnin jälkeen solususpensio homogenisoitiin resuspensoimalla, suodatettiin silkkikankaan (77 µm) läpi ja solut pestiin RPMI-1640-liuoksella, johon oli lisätty 5 mM EDTA. Lopuksi solut resuspensoitiin PBS-liuokseen.

2.3.2 Solujen vasta-ainevärjäys

Virtaussytometriaa varten solut värjättiin suoralla menetelmällä eli vasta-aine on leimattu fluoresoivalla merkkiaineella ja se tarttuu spesifisesti suoraan epitooppiin. Sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyypitystä varten solut värjättiin 96-kuoppalevyllä ja lajittelevaa virtaussytometriaa varten FACS-putkissa. Lajittelevaa virtaussytometriaa varten yhden pentueen maksoista eristetyt solut sekoitettiin keskenään ennen värjäystä. Solut pelletoitettiin sentrifugilla (96-kuoppalevy; 3 minuuttia 500 x g, FACS-putket; 1,5 minuuttia 1006 x g) aina ennen kuin solut resuspensoitiin seuraavaan liuokseen. Värjäyksen ajan solut pidettiin jäällä valolta suojattuna.

Ensin soluista värjättiin kuolleet solut 20–30 minuutin ajan niiden sisään kulkeutuvalla Fixable Viability Dye eFluor 780 väriaineella (1:1000) (Invitrogen, 65–0865). Sitoutumaton väriaine pestiin pois kahdesti EPICS I-liuoksella (liite 1). Antigeenispesifisten vasta-aineiden (taulukko 1 ja 2) epäspesifinen sitoutuminen FcyIII- ja FcyII-reseptoreihin estettiin värjäämällä solut leimaamattomalla CD16/32 vasta-aineella (1:100) (Bio X Cell CUSTOM24G2, 603816M1) 5 minuutin ajan. Leimaamatonta vasta-ainetta ei pesty pois ennen konjugoitujen vasta-aineiden lisäämistä.

Fenotyyppitystä varten solut värjättiin neljällä eri vasta-aineella (taulukko 3) ja lajittelevaa virtausytometriaa varten viidellä eri vasta-aineella (taulukko 4). Solut värjättiin vasta-aineilla 20–30 minuutin ajan ja sitoutumaton vasta-aine pestiin pois kahdesti EPICS I-liuoksella. Värjätyt solut resuspensoitiin EPICS I-liuokseen, tai jos virtausytometriaa ei tehty samana päivänä, solut fiksoitiin FACS fix –liuokseen (liite 1) ja säilöttiin + 4 °C:ssa valolta suojaatuna. Kontrollisolut käsiteltiin kuten edellä, mutta niitä ei värjätty antigeenispesifisillä vasta-aineilla. Virtausytometriset näytteet analysoitiin BD LSR Fortessa -virtausytometrillä ja data käsiteltiin FlowJo -ohjelmalla (versio 10.7.2). Tilastolliset analyysit tehtiin Prism – GraphPad -ohjelmalla ja kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA).

Ennen lajittelevaa virtausytometriaa FACS-putket ja solujen keräysputket pinnoitettiin tunnin ajan vasikan sikiön seerumilla (FCS) huoneenlämmössä. Pinnoite estää soluja tarttumasta putkien seinämiin. Ennen lajittelevaa virtausytometriaa solususpensio suodatettiin filterikorkin läpi uusiin FACS-putkiin ja solususpensio laimennettiin puskuriliuoksella (liite 1). Solususpensiosta lajiteltiin ja kerättiin talteen LYVE-1⁺ sekä LYVE-1⁺ CD31⁺ sinusoidaaliset endoteelisolut Sony SH800 -lajittelevalla virtausytometrillä. Solut kerättiin RNAlater RNA Stabilization Reagent -liuokseen (Qiagen) ja säilöttiin - 20°C:ssa RNA:n eristykseen asti. Saatu data analysoitiin FlowJo -ohjelmalla (versio 10.7.2).

Taulukko 3. Virtaussytometriassa käytetyt konjugoidut vasta-aineet.

Antigeeni	Fluorokromi	Isäntäeläin	Valmistaja ja tuotenumero	Eränumero	Laimennossuhde
CD45	PerCP-Cy5.5	Rotta	BD Pharmingen, 550994/561869	0300800	1:200
LYVE-1	PE	Rotta	R&D Systems, FAB2125P	ACFE0115031	1:400
CD31	APC	Rotta	BioLegend, 102510	B312609	1:200
MECA-32	A488	Rotta	BioLegend, 120506	B277044	1:200

Taulukko 4. Lajittelevassa virtaussytometriassa käytetyt konjugoidut vasta-aineet.

Antigeeni	Fluorokromi	Isäntäeläin	Valmistaja ja tuotenumero	Eränumero	Laimennossuhde
CD11b	BB515	Rotta	BD Pharmingen, 564454	5337583	1:200
CD3	FITC	Rotta	BioLegend, 100203	B321980	1:200
CD45	A488	Rotta	BioLegend, 103122	B285085	1:200
LYVE-1	PE	Rotta	R&D Systems, FAB2125P	ACFE0115031	1:400
CD31	APC	Rotta	BioLegend, 102510	B312609	1:200

2.3.3 RNA:n eristys ja cDNA-synteesi

RNA eristettiin lajitelluista sinusoidaalisisista endoteelisoluista RNeasy Plus Micro Kitillä (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaisesti. Eristetyn RNA:n pitoisuus määritettiin NanoDrop-laitteella ja saatu RNA käännettiin cDNA:ksi SensiFAST cDNA Synthesis Kitillä (Meridian Bioscience) valmistajan ohjeen mukaisesti. Saatu cDNA lähetettiin yksisolusekvensointiin (Single Cell Omics, Turku Bioscience) geenitiedon kartoittamiseksi.

3. TULOKSET

3.1 Alkion maksan immunofluoresenssivärjäys

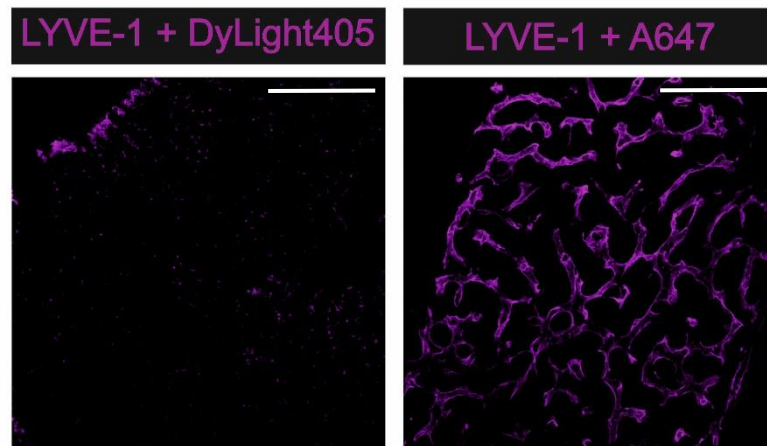
Whole mount -värjäysten tarkoituksena oli osoittaa mikroskooppisesti sinusoidaalisten endoteelisolujen sekä Plvap-proteiinin sijainti alkion maksassa eri ikäpisteissä. Ikäsarjan avulla havainnoitiin myös sinusoidien kehitystä alkionkehityksen aikana. Whole mount -värjäys on vaativa sekä aikaa vievä menetelmä ja protokolla vaatii usein pitkääkin optimointia, jotta saadaan luotettavia tuloksia. Tässä työssä optimoitiin kudoksen käsittely ja värjäysprotokolla toimiviksi ja valikoitiin vasta-aineet, jotka sitoutuvat spesifisesti tutkittaviin alkion maksan sinusoidaalisiin endoteelisoluihin. Näiden vasta-aineiden avulla pystyttiin myöhemmin eristämään halutut solut muista maksan soluista. Tiettyjen vasta-aineiden oli todettu toimivan aiemmin tehdyissä alkion maksan jääleikevärjäyksissä, mutta whole mount -värjäyksissä niitä ei ollut testattu.

3.1.1 Whole mount -värjäysten optimointi

Maksakudos sisältää paljon verta, joka autofluoresoi ja siten häiritsee kuvaamista mikroskoopilla. Veren poistamiseksi kudoksia inkuboitiin tunnin ajan hepariini-PBS-liuoksessa (1:30) (hepariini LEO 100 IU/ml) tasoravistelijassa +4°C:ssa. Käsittely ei kuitenkaan ollut riittävä, joten lopulta päädyttiin käyttämään vahvempaa hepariini-PBS-liuosta (1:20) ja korkeampaa inkubaatiolämpötilaa (huoneenlämpö, 1 h).

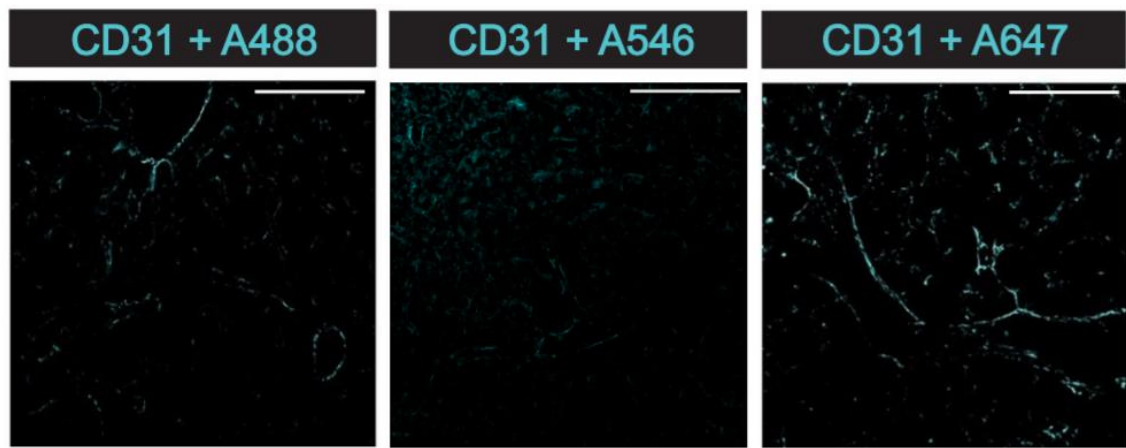
Hepariinikäsittelyn jälkeen kudokset fiksoitiin PFA:lla (paraformaldehydi). Fiksaation tarkoituksena on estää solujen autolyysi eli pysäyttää entsyymitoiminta ja estää bakteerikasvua sekä pitää kudos mahdollisimman alkuperäisessä muodossa ilman rakenteiden muuttumista tai häviämistä. Yleensä whole mount- värjäyksiin käytettävät kudokset fiksoidaan 4 % PFA:lla ja alhaisen pitoisuuden vuoksi fiksausajat ovat usein pitkiä. Tässä työssä kudokset päädyttiin fiksaamaan 2 % PFA:lla tutkimusryhmän aikaisempien havaintojen perusteella. Fiksaatioaikaa optimoitiin niin, että solujen antigeneinä toimivat reseptorit pysyvät alkuperäisessä muodossa, jolloin vasta-aineet tunnistavat ne. Lopulta maksoja päädyttiin fiksoimaan 20 minuutin ajan jäällä. Whole mount -värjäyksissä voidaan käyttää kokonaista elintä tai alkiota, mutta tässä työssä maksa valettiin agarosiin ja maksasta leikattiin värjäyksiin vibratomilla 500 µm:n paksuisia leikkeitä.

Maksakudoksen käsittelyprosessin optimoinnin lisäksi myös vasta-aineiden pitoisuudet ja sopivat sekundaarivasta-aineet testattiin. Anti-LYVE-1 primaarivasta-ainetta (ReliaTech) oli testattu jo aiemmin tutkimusryhmässä laimennossuhteella 1:50 ja tämän oli havaittu toimivan värjäyksissä hyvin. Sekundaarivasta-aineina testattiin Alexa Fluor DyLight405-, A488 -ja A647-leimattuja vasta-aineita. A488 vasta-aineella signaalia ei saatu ollenkaan (tulosta ei esitetty). DyLight405 vasta-aineella signaali oli heikko (kuva 8). Paras signaali havaittiin A647 sekundaarivasta-aineella (kuva 8), joten sitä käytettiin kaikissa värjäyksissä (1:500 laimennos).



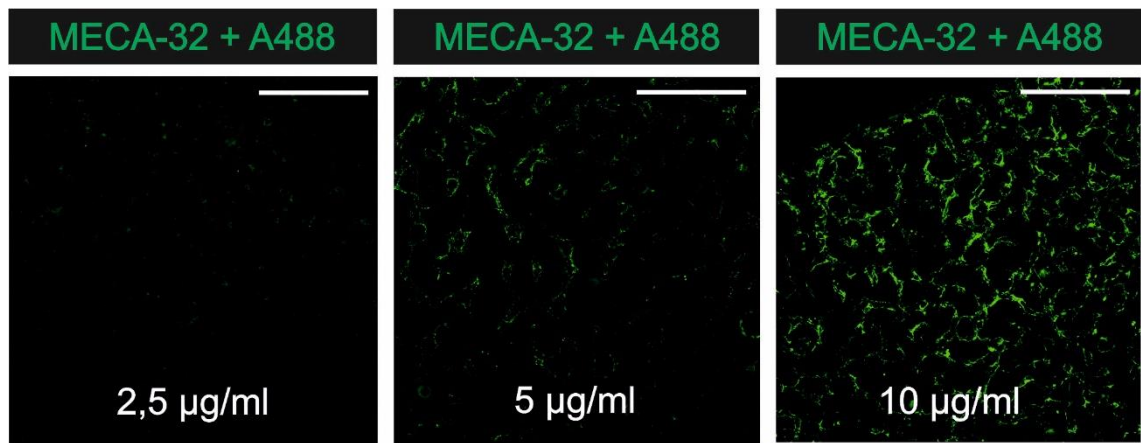
Kuva 8. Anti-LYVE-1 primaarivasta-aineelle sopivan sekundaarivasta-aineen testaus. DyLight405 sekundaarivasta-aineella signaali oli heikko. Paras tulos saatiin A647 vasta-aineella, joten sitä käytettiin kaikissa värjäyksissä. Mittajana 100 μm .

Anti-CD31 primaarivasta-ainetta (BD Pharmingen) oli testattu aiemmin laimennossuhteella 1:100 ja tämän oli havaittu toimivan värjäyksissä hyvin. Sekundaarivasta-aineina testattiin Alexa Fluor A488, A546 ja A647 -leimattuja vasta-aineita. A546 sekundaarivasta-aineella signaali oli heikko ja vasta-ainetta sitoutui epäspesifisesti (kuva 9). A488 sekundaarivasta-aine toimi hyvin, mutta A647 vasta-aineella saatiin vahvempi signaali (kuva 9), joten se valittiin värjäyksiin (1:500 laimennos).



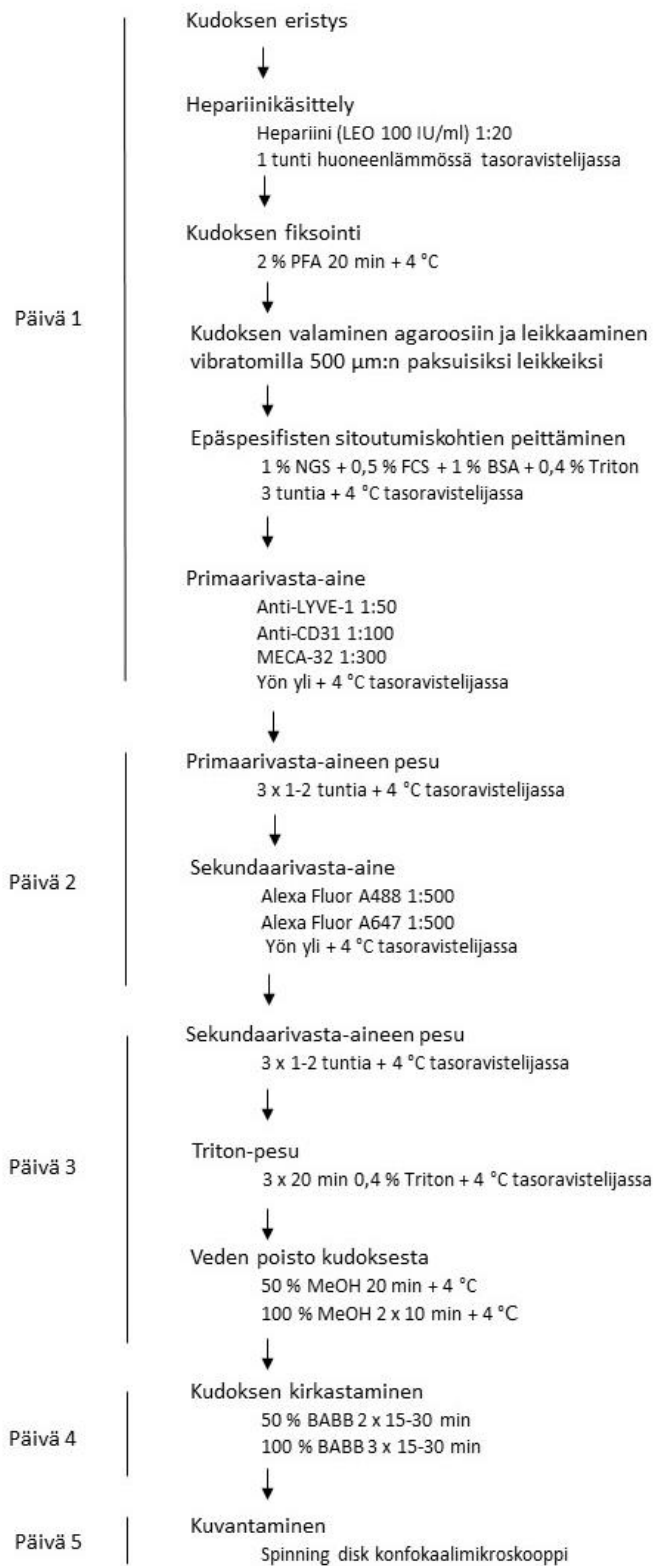
Kuva 9. Anti-CD31 primaarivasta-aineelle sopivan sekundaarivasta-aineen testaus. A546 vasta-aineella sitoutumista tapahtui epäspesifisesti, mikä aiheutti taustan värjäytymistä. A647 vasta-aineella signaali oli hieman vahvempi kuin A488 vasta-aineella, joten se valittiin värjäykseen. Mittajana 100 μm .

Whole mount -värjäysten haasteena on usein näytteen taustan värjäytyminen, mikä voi johtua esimerkiksi vasta-aineiden epäspesifisestä sitoutumisesta, kudoksen käsittelystä, leikkeiden kuivumisesta tai liian paksuista leikkeistä. Aluksi Plvap-proteiini havainnoitiin kudoksesta MECA-32 vasta-aineella niin sanotulla suoralla menetelmällä. Suoran menetelmän etuna on nopeus ja useamman vasta-aineen käyttäminen samanaikaisesti ilman riskiä ristiin reagoinnista. Suoraa menetelmää testattiin konjugoidulla MECA-32 vasta-aineella usealla eri konsentraatioilla ja taustan värjäytymistä ehkäistiin rotan isotyypikontrollilla, mutta saatu signaali oli hyvin heikko (tulosta ei esitetty), joten värjäyksiä jatkettiin epäsuoralla menetelmällä. Isotyypikontrolli on primaarinen vasta-aine, jolla ei ole spesifisyyttä kohteelle, joten sitä voidaan käyttää negatiivisena kontrollina epäspesifisen taustasignaalin erottamisesta spesifisestä vasta-ainesignaalista. MECA-32 primaarivasta-ainetta testattiin konsentraatioilla 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ ja 10 $\mu\text{g/ml}$, kunnes saatiin tarpeeksi vahva signaali (kuva 10). Värjäykseen käytettiin 10 $\mu\text{g/ml}$ (1:300) konsentraatiota. MECA-32 primaarivasta-aineelle testattiin Alexa Fluor A488- ja A647-konjugoituja sekundaarivasta-aineita, joista A647 vasta-aineesta ei saatu signaalia (tulosta ei esitetty), joten värjäykseen valittiin A488



Kuva 10. MECA-32 vasta-aineen testaus. MECA-32 primaarivasta-ainetta testattiin konsentraatioilla 2,5 µg/ml, 5 µg/ml ja 10 µg/ml, kunnes saatiin sopiva signaali. Mittajana 100 µm.

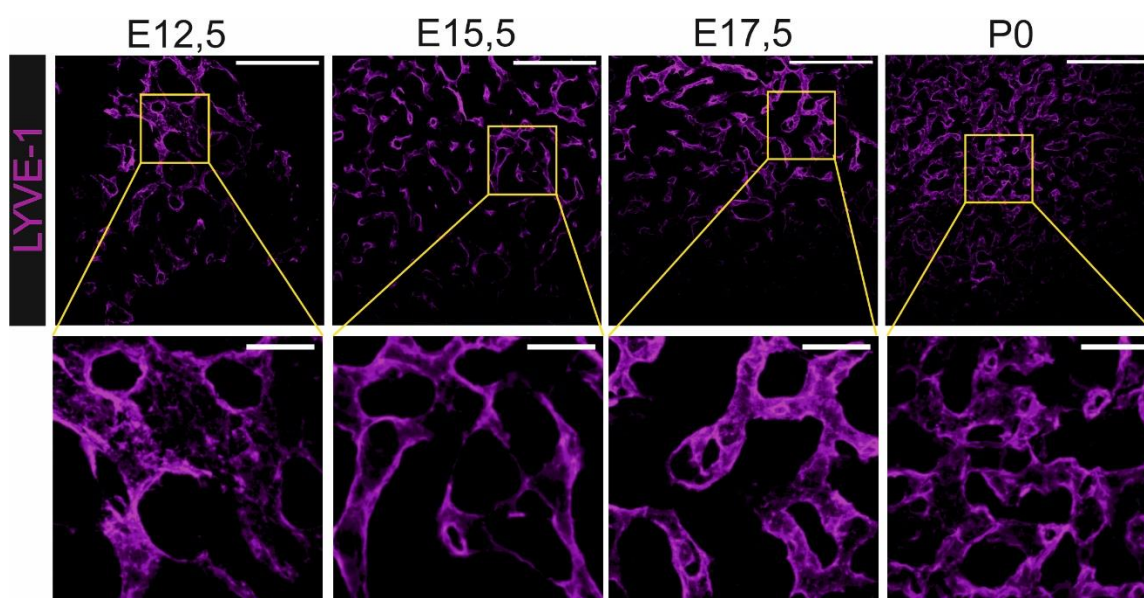
Vasta-ainevärjäyksien jälkeen whole mount -maksaleikkeet kirkastettiin ennen kuvaamista. Kirkastamisen tavoitteena on saada kudokset läpinäkyväksi, mikä estää näkyvän aallonpituuden valon tunkeutumista kudokseen häiriten mikroskopointia, minimoi valonsirontaa ja absorptiota. Maksassa oleva veri aiheuttaa haasteita kudoksen kirkastamiseen. Kirkastavan BABB-kirkastusliuoksen vaikutusaika sekä se, kuinka monta kertaa liuos vaihdettiin tuoreeseen, optimoitiin tarkasti. Kudokset saatiin läpinäkyviksi, mutta ne jäivät aina hieman kellertäviksi, mikä ei kuitenkaan merkittävästi haitannut kuvaamista. Optimoitu whole mount -värjäysprotokolla on esitetty kuvassa 11.



Kuva 11. Alkion maksan whole mount -värjäysten protokolla. Maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen immunofluoresenssivärjäyksiin whole mount -tekniikalla optimoitiin kudoksen käsittely, vasta-ainevärjäys sekä kudoksen kirkastaminen kuvantamista varten.

3.1.2 LYVE-1:n ilmentyminen

Alkioikäisten (E12,5; E15,5; E17,5) ja vastasyntyneiden (P0) hiirten alkion maksaleikkeet värjättiin sinusoidaalisten endoteelisolujen pinta-antigeeneihin sitoutuvalla monoklonaalisella anti-LYVE-1 primaarivasta-aineella. Kuvasta 12 havaitaan, että LYVE-1⁺ endoteelisolut muodostavat selkeän sinusoidien verkoston jokaisessa ikäpisteessä ja verkosto kehittyy sikiönkehityksen aikana laajemmaksi ja haaroittuneemmaksi. Värjäyksen perusteella näyttää siltä, että LYVE-1 ei ilmenny ei-sinusoidaalisisissa eikä ei-vaskulaarisissa solutyypeissä missään kehitysvaiheessa. Tulokset viittaavat siihen, että LYVE-1-vasta-aine sitoutuu spesifisesti sinusoidia vuoraaviin endoteelisoluihin, joten sitä voidaan käyttää erottelemaan sinusoidaaliset endoteelisolut muista maksan soluista.

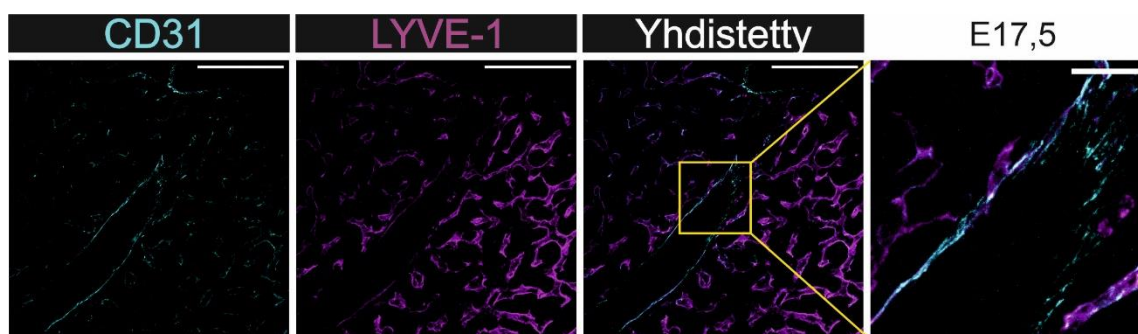


Kuva 12. Anti-LYVE-1 vasta-aine värjää spesifisesti kehittyvän maksan sinusoidaaliset endoteelisolut. LYVE-1 ilmentyy maksan sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa, jotka muodostavat sinusoidiverkoston. Muissa kuin sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa ei havaita LYVE-1:n ilmentymistä. Mittajana 100 μm , suurennoksissa 20 μm .

3.1.3 CD31:n ilmentyminen

Alkioikäisten (E12,5; E15,5; E17,5) ja vastasyntyneiden (P0) hiirten alkion maksaleikkeet värjättiin verisuonten endoteelisolujen pinta-antigeeneihin sitoutuvalla anti-CD31-vasta-aineella ja sinusoidaalisten endoteelisolujen pinta-antigeeneihin sitoutuvalla monoklonaalisella anti-LYVE-1 primaarivasta-aineella. Kuvasta 13

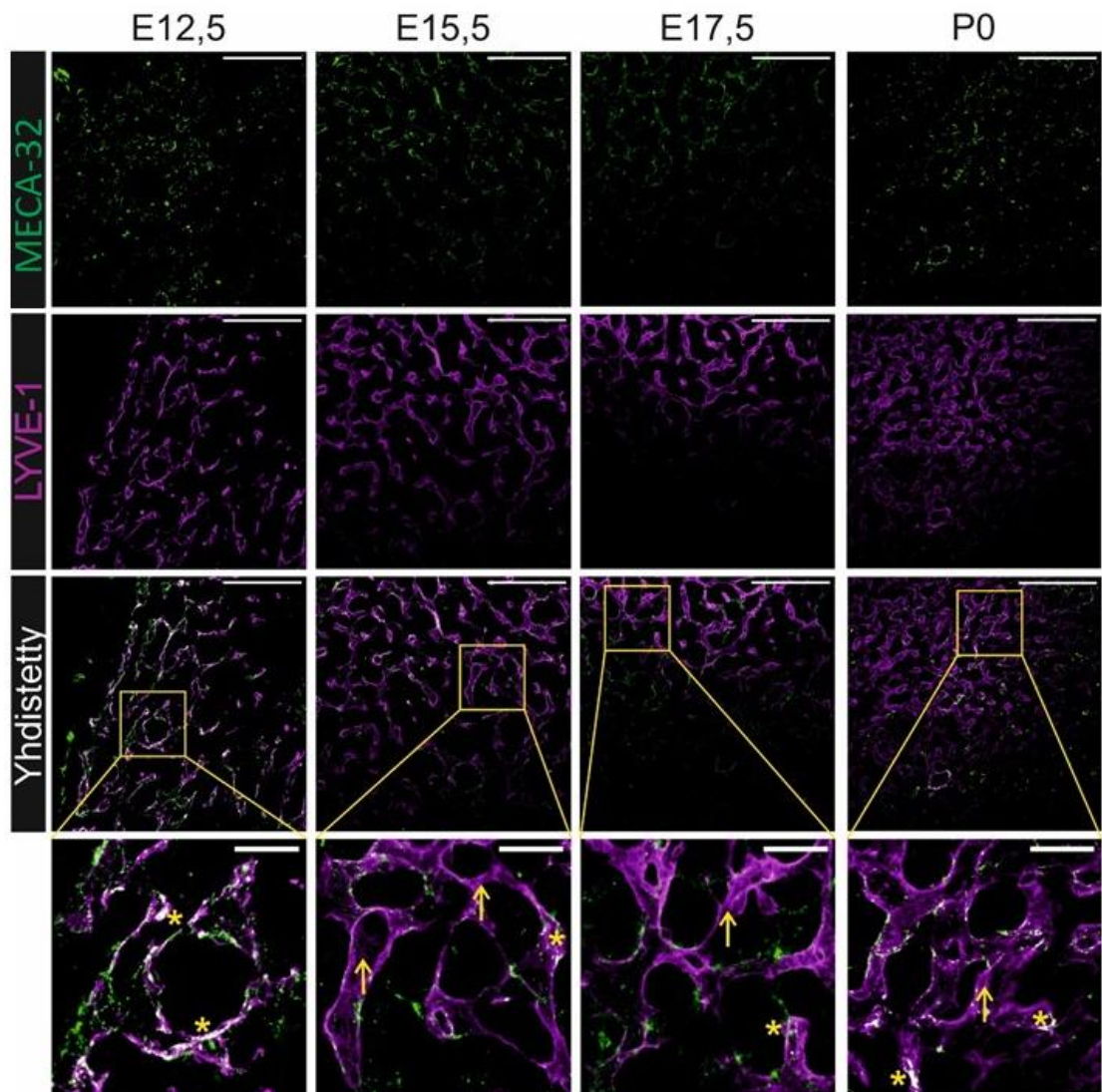
nähdään, että CD31 ilmentyy sinusoidaalisissa endoteelisoluissa sekä maksan suuremmissa verisuonissa eli porttilaskimon tai keskuslaskimon endoteelisoluissa. CD31:n ei havaita sitoutuvan ei-vaskulaarisiin soluihin. Kuvan 13 LYVE-1-värjäys tukee edellä havaittua tulosta siitä, ettei LYVE-1 ilmenny muissa maksan soluissa kuin sinusoidaalisissa endoteelisoluissa. Värjäystulokset osoittavat selkeästi, että CD31-vasta-ainetta voidaan käyttää erottelemaan maksan endoteelisolut muista maksan soluista ja yhdessä LYVE-1-vasta-aineen avulla voidaan erotella sinusoidaaliset endoteelisolut.



Kuva 13. Anti-CD31 vasta-aine värjää kaikki maksan vaskulaariset endoteelisolut. CD31 (sininen) ilmentyy sinusoidaalisissa endoteelisoluissa ja porttilaskimon sekä keskuslaskimon endoteelisoluissa. LYVE-1 (violetti) ilmentyy vain sinusoidaalisissa endoteelisoluissa. Mittajana 100 μm , suurennoksessa 20 μm .

3.1.4 Plvap:n ilmentyminen

Plvap-proteiinin esiintymisen havaitsemiseksi maksan soluissa alkioikäisten (E12,5; E15,5; E17,5) ja vastasyntyneiden (P0) hiirten alkion maksaleikkeet värjättiin Plvap-proteiinin sitoutuvalla monoklonaalisella anti-Plvap MECA-32-vasta-aineella ja sinusoidaalisten endoteelisolujen pinta-antigeeneihin sitoutuvalla monoklonaalisella anti-LYVE-1 primaarivasta-aineella. Kuten kuvasta 14 havaitaan, Plvap paikantuu pistemäisenä LYVE-1⁺ endoteelisoluihin kaikissa ikäpisteissä. Kuvasta 14 havaitaan lisäksi, että kaikissa sinusoidaalisissa endoteelisoluissa ei ilmennetä Plvap-proteiinia.



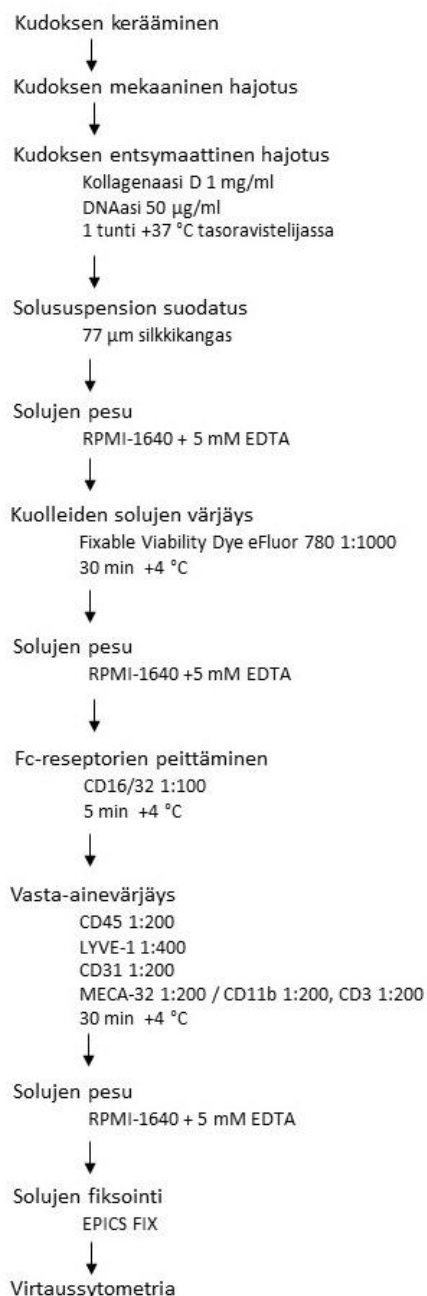
Kuva 14. Plvap-proteiinia ilmentyy sinusoidaalisissa endoteelisoluissa kaikissa ikäpisteissä. Plvap eli MECA32 (vihreä) ilmentyy maksan rakenteessa pistemäisenä. LYVE-1 (violetti) ilmentyy maksan sinusoidaalisissa endoteelisoluissa, jotka muodostavat sinusoidien verkoston. Yhdistetyissä kuvissa ja suurennoksissa nähdään, että osa soluista on pelkästään LYVE-1⁺ ja Plvap-proteiinia esiintyy LYVE-1:tä ilmentävissä soluissa. Nuolilla merkattuna esimerkkejä LYVE-1⁺ soluista ja tähdillä merkattuna esimerkkejä LYVE-1⁺ MECA32⁺ soluista. Mittajana 100 µm, suurennoksissa 20 µm.

3.2 Alkion maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyypitys

3.2.1 Maksakudoksen käsittelyn optimointi virtaussytometriaan

Solujen eristys maksasta optimoitiin ennen varsinaisten virtaussytometrinen analyysien aloittamista. Sinusoidaalisia endoteelisoluja on maksan soluista vain pieni osa, joten niitä on haastavaa tutkia ja eristää erityisesti kehittyvästä alkiosta, jonka maksa on hyvin pieni aikuisen maksaan verrattuna. Virtaussytometriaa varten tutkittava kudos pitää hajottaa

solususpensioksi. Maksakudos hajotettiin suspensioksi mekaanisesti ja entsyymaattisesti tutkimusryhmän käyttämän protokollan mukaan. Solususpensiosta yritettiin ensin erotella erikseen parenkymaaliset ja ei-parenkymaaliset solut, jonka jälkeen oli tarkoitus erotella Percoll-gradienttisentrifugaatiolla sinusoidaaliset endoteelisolut ja Kupfferin solut soludebriksestä, kuolleista soluista, punasoluista ja elävistä hepatosyyteistä. Tämä menetelmä ei kuitenkaan toiminut odotetusti. Seuraavaksi kokeiltiin parenkymaalisten ja ei-parenkymaalisten solujen erottelua sentrifugaatiolla. Solususpensio sentrifugoitiin ja supernatantti poistettiin, kunnes jäljelle jäi vain ei-parenkymaalisten solujen pelletti. Tästäkin menetelmä ei toiminut odotetusti ja lopulta vasta-ainevärjäykseen päädyttiin käyttämään maksasoluja, jotka oli saatu mekaanisen ja entsyymaattisen hajotuksen ja suodattamisen jälkeen. Tällä metodilla eristetyt solut pysyivät parhaiten hengissä ja sinusoidaalisia endoteelisoluja menetettiin mahdollisimman vähän. Tavoitteena oli, ettei käsittely vaikuttanut solujen ilmiäsuun eli reseptorit pysyivät alkuperäisessä muodossa. Optimoitu käsittely- ja värjäysprotokolla virtausytometriaan on esitetty kuvassa 15.

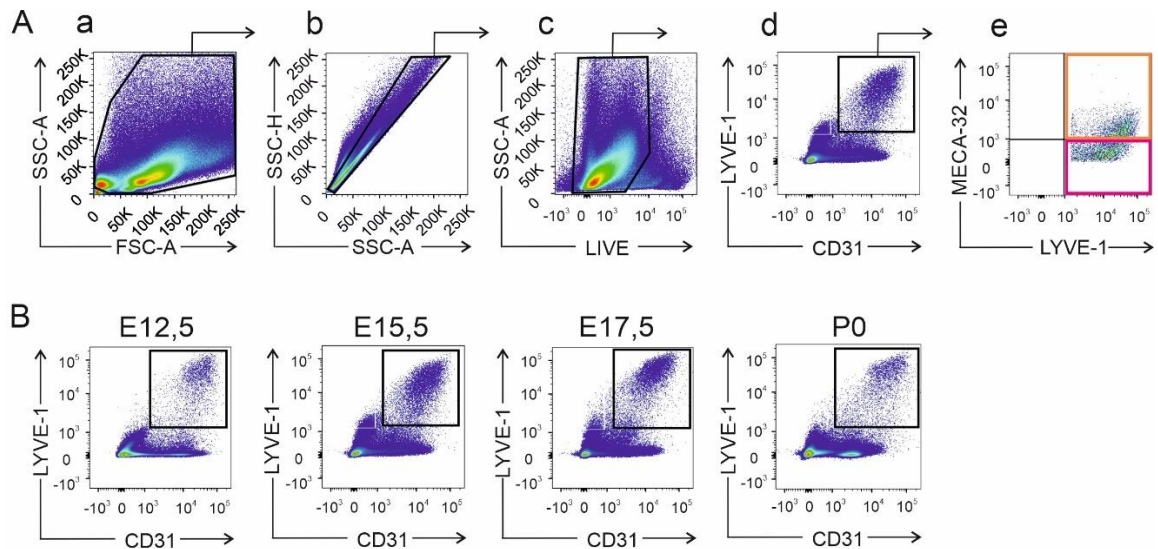


Kuva 15. Solujen käsittelyprotokolla virtaussytometrisiin analyyseihin. Hiiren alkion kudoksen käsittely optimoitiin maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen eristystä ja fenotyypitystä varten. Kudoksesta hajotettiin ensin solususpensioksi ja solut värjättiin vasta-aineilla ennen virtaussytometriä.

3.2.3 Virtaussytometrisen analyysiprosessin malli

Virtaussytometrian tulokset analysoitiin FlowJo-ohjelmalla rajaamalla solut valon sironnan ja vasta-aineiden fluoresenssin perusteella (kuva 16 A). Valon sivu- ja suorasiironnan avulla eroteltiin ensin soludebris eli kuolleet solut elävistä koon ja granulaisuuden mukaan (kuva 16 a). Sivusironnan avulla eroteltiin myös yksittäiset solut toisiinsa takertuneista soluista (kuva 16 b). Elävät solut rajattiin kuolleista Fixable

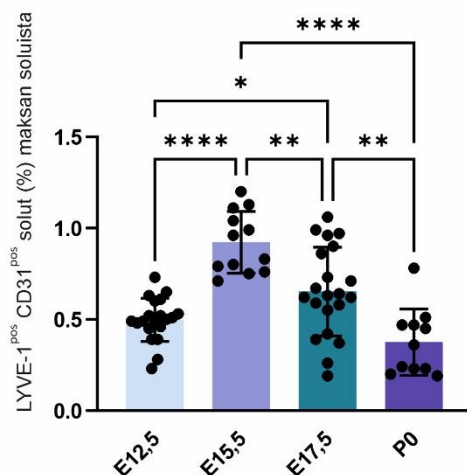
Viability Dye eFluor 780 väriaineen avulla, joka kulkeutuu kuolleisiin soluihin (kuva 16 c). Seuraavaksi rajattiin LYVE-1⁺ CD31⁺ positiiviset solut eli sinusoidaaliset endoteelisolut muista maksan soluista (kuva 16 d). Tästä populaatiosta tarkasteltiin erikseen MECA-32⁺ soluja eli Pivap-proteiinia ilmentäviä soluja ja MECA-32⁻ soluja (kuva 16 e). Kuvassa 13 B on esitetty esimerkkikuvat sinusodaalisten endoteelisolujen populaatiosta eri ikäpisteissä.



Kuva 16. Solupopulaatiot rajattiin FlowJo-ohjelmalla analyysimallin mukaisesti. (A) Soluista rajattiin pois soludebris (a), toisiinsa takertuneet solut (b) ja elävät solut (c). Jäljelle jääneestä populaatiosta tarkasteltavaksi rajattiin LYVE-1⁺ CD31⁺ solut(d), jotka jaettiin erikseen MECA-32⁺ solut ja MECA-32⁻ solupopulaatioihin (e). (B) Esimerkkikuvat eri ikäpisteiden LYVE-1⁺ CD31⁺ solupopulaatioiden rajauksesta.

3.2.4 LYVE-1⁺ ja CD31⁺ solujen osuus

Endoteelisolumarkkereiden LYVE-1 ja CD31 avulla määritettiin sinusoidaalisten endoteelisolujen määrä maksassa ja muuttuiko niiden suhteellinen osuus alkionkehityksen aikana. Kuvasta 17 havaitaan, että LYVE-1⁺ ja CD31⁺ solujen osuus kaikista eristetyistä maksan soluista vaihteli 0,5–1,3 % alkionkehityksen aikana. Kyseessä on siis hyvin pieni, maksassa esiintyvä solupopulaatio. LYVE-1⁺ ja CD31⁺ solujen osuus kasvoi alkio päivästä 12,5 alkio päivään 15,5 ja väheni merkittävästi alkio päivästä E15,5 syntymään (P0).



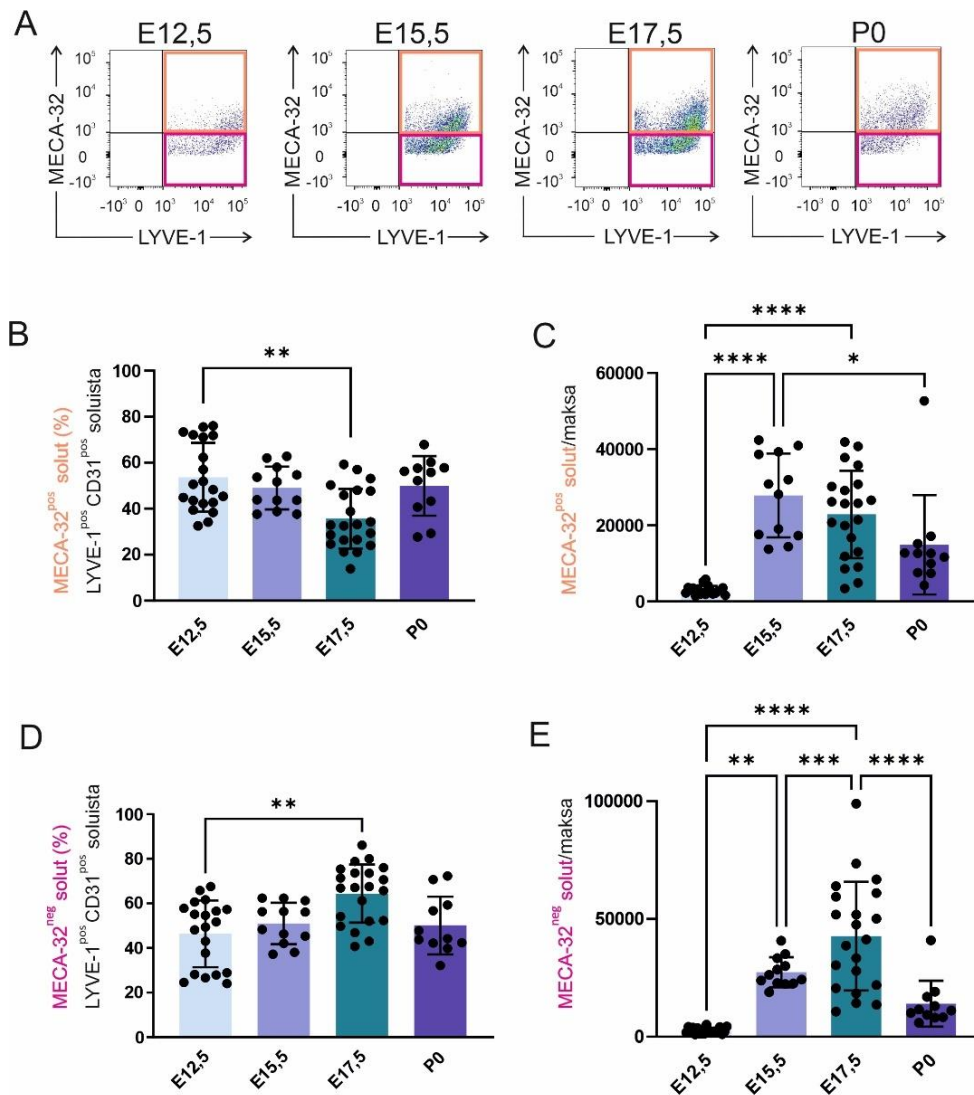
Kuva 17. Sinusoidaalisten endoteelisolujen osuus maksan soluista vaihteli alkionkehityksen aikana. LYVE-1⁺ CD31⁺ solujen eli sinusoidaalisten endoteelisolujen osuus prosentteina eri ikäpisteissä kaikista maksan soluista. LYVE-1⁺ CD31⁺ soluja on keskimäärin alle 1 % maksan soluista. n=20 (E12,5), n=12 (E15,5), n=21 (E17,5), n=11 (P0). Tilastollista merkittävyyttä mitattiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001.

3.2.5 Plvap:n ilmentyminen LYVE-1⁺ CD31⁺ soluissa

Virtausytometrialla selvitettiin lisäksi MECA-32⁺ ja MECA-32⁻ eli solujen määrät Plvap-proteiinia ilmentävien hiirten alkion sinusoidaalisista endoteelisoluista. Tarkoituksena oli selvittää kuinka suuri osa sinusoidaalisista endoteelisoluista ilmentää Plvap-proteiinia (MECA-32⁺) ja kuinka suuri osa ei (MECA-32⁻) ja muuttuuko näiden solujen keskinäinen osuus alkionkehityksen aikana. Lisäksi selvitettiin kuinka paljon MECA-32⁺ ja MECA-32⁻ soluja esiintyy alkion maksassa eri ikäpisteissä. Kuvassa 18 A on esitetty esimerkkikuvat näiden populaatioiden rajaamisesta eri ikäpisteissä.

Kuvasta 18 B nähdään, että MECA-32⁺ solujen osuus sinusoidaalisista endoteelisoluista (LYVE-1⁺ CD31⁺) pysyy melko tasaisena alkio päivästä 12,5 syntymään asti. Keskimäärin 38–50 % sinusoidaalisista endoteelisoluista ilmentää Plvap-proteiinia alkionkehityksen aikana. Alkiopäivien 12,5 ja 17,5 välillä MECA-32⁺ solujen osuus sinusoidaalisista endoteelisoluista laskee hieman. Kuvasta 18 C havaitaan, että MECA-32⁺ solujen määrä kaikista maksan soluista vaihtelee kuitenkin eri ikäpisteiden välillä. Alkiopäivästä E12,5 alkaen MECA-32⁺ solujen määrä kasvaa merkittävästi alkio päiviin E15,5 ja E17,5 verrattuna. MECA-32⁺ soluja on kuitenkin merkittävästi vähemmän vastasyntyneen (P0) maksassa kuin E15,5 ikäisen alkion maksassa.

Kuvasta 18 D nähdään, että vastaavasti MECA-32⁻ solujen osuus sinusoidaalisista endoteelisoluista pysyy melko tasaisena alkio päivästä 12,5 syntymään asti (LYVE-1⁺ CD31⁺). Alkio päivien 12,5 ja 17,5 välillä MECA-32⁻ solujen osuus sinusoidaalisista endoteelisoluista laskee hieman. Kuvasta 18 E havaitaan, että MECA-32⁻ solujen määrä alkion ja vastasyntyneen (P0) maksassa vaihtelee kuitenkin eri ikäpisteiden välillä. MECA-32⁻ solujen määrä kasvaa merkittävästi alkionkehityksen aikana alkio päivään 17,5 asti, kunnes niiden määrä laskee vastasyntyneellä (P0).



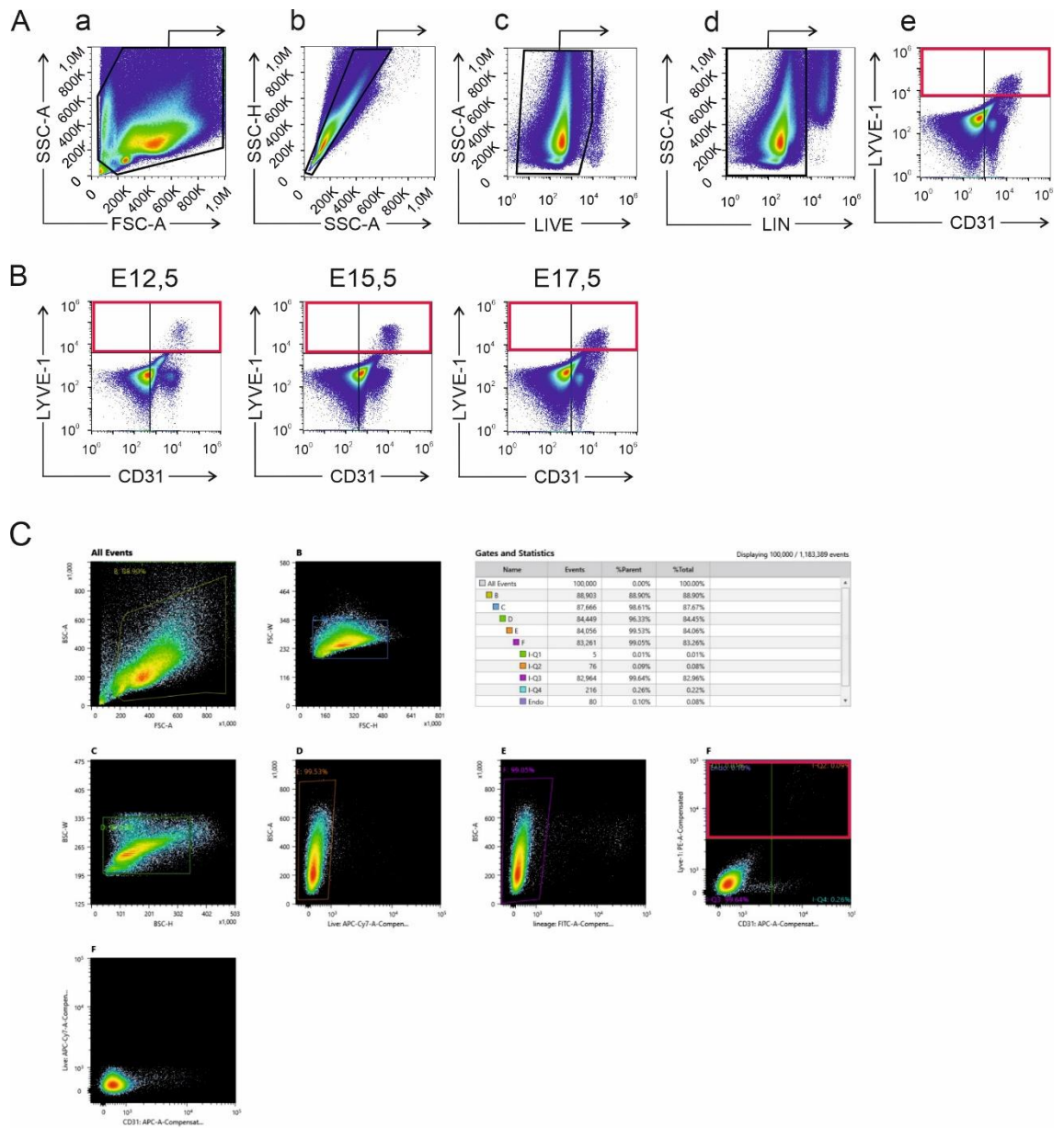
Kuva 18. Virtaussytometrinen analyysi hiiren alkion ja vastasyntyneen maksan sinusoidaalisista endoteelisoluista. (A) Esimerkkikuvat eri ikäpisteiden LYVE-1⁺ MECA-32⁺ ja LYVE-1⁺ MECA-32⁻ solujen rajauksesta. (B) MECA-32⁺ solujen osuus (%) LYVE-1⁺ CD31⁺ sinusoidaalisista endoteelisoluista eri ikäpisteissä. (C) MECA-32⁺ solujen määrä keskimäärin yhdessä alkion maksassa eri ikäpisteissä. (D) MECA-32⁻ solujen osuus (%) LYVE-1⁺ CD31⁺ sinusoidaalisista endoteelisoluista eri ikäpisteissä. (E) MECA-32⁻ solujen määrä keskimäärin yhdessä alkion maksassa eri ikäpisteissä. n=20 (E12,5), n=12 (E15,5), n=21 (E17,5), n=11 (P0). Tilastollista merkittävyyttä mitattiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

3.3 Sinusoidaalisten endoteelisolujen kerääminen

Virtaussytometrinen analyysi jälkeen tarkoituksena oli eristää sinusoidaaliset endoteelisolut lajittelevalla virtaussytometrillä yksisolusekvensointia varten. Virtaussytometrialla selvisi, että sinusoidaalisia endoteelisoluja on keskimäärin alle 1 % kaikista maksan soluista koko alkionkehityksen ajan, joten kyseessä on hyvin pieni solupopulaatio. Lajittelevalla virtaussytometrialla selvitettiin, pystytäänkö maksasta eristämään tarpeeksi soluja yksisolusekvensointiin. Maksa hajotettiin solususpensioksi ja solut värjättiin samalla tavalla kuten fenotyypianalyysissä. Whole mount -värjäyksillä ja virtaussytometrialla oli jo aiemmin varmistettu, että käytettävillä vasta-aineilla saadaan luotettavasti eroteltua sinusoidaaliset endoteelisolut muista maksan soluista.

3.3.1 Lajittelevan virtaussytometrian analyysimalli

Solupopulaatiot rajattiin Flow Jo -ohjelmalla kuvan 19 C analyysimallin mukaisesti. Valon sivu- ja suorasiirron avulla eroteltiin ensin soludebris eli kuolleet solut elävistä koon ja granulaisuuden mukaan (kuva 19 a). Sivusiirron avulla eroteltiin myös yksittäiset solut toisiinsa takertuneista soluista (kuva 19 b). Elävät solut rajattiin kuolleista värin avulla, joka kulkeutuu kuolleisiin soluihin (kuva 19 c). Seuraavaksi linjamarkkereilla (*engl.* lineage markers, LIN) rajattiin pois T-lymfosyytit (CD3), hematopoieettiset solut (CD45) ja leukosyytit (CD11b). Jäljelle jääneistä solupopulaatiosta rajattiin lajiteltaviksi LYVE-1⁺ yksittäispositiiviset ja LYVE-1⁺ CD31⁺ tuplapositiiviset solut. Solupopulaatioiden rajaus on esitetty yli jääneistä lajittelemattomista solususpensioista, joista tehtiin virtaussytometriset analyysit ja analysoitiin FlowJo-ohjelmalla. Kuvassa 19 B on esitetty lajiteltu ja talteen kerätty solupopulaatio eri ikäpisteissä. Kuvassa 19 C on esitetty esimerkkikuva lajittelun hetkellä. Lajittelevalla virtaussytometrillä populaatiot rajattiin edellä esitetyn analyysimallin mukaisesti, mutta eri laitteesta johtuen näkymä on erilainen.

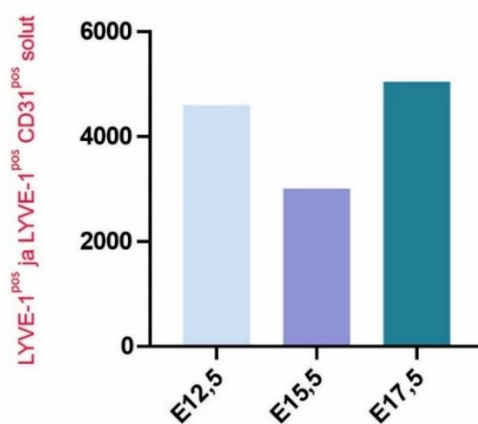


Kuva 19. Hiiren alkion sinusoidaalisten endoteelisolujen lajittelu virtausytometrillä. (A) Solupopulaatiot rajattiin FlowJo-ohjelmalla analyysimallin mukaisesti. Soluista rajattiin soludebris (a), toisiinsa takertuneet solut (b), elävät solut (c) ja lopuksi tuplapositiiviset LYVE-1⁺ CD31⁺ ja yksittäispositiiviset LYVE-1⁺ solut. (B) esimerkkikuvat lajitellusta ja talteen kerätystä LYVE-1⁺ CD31⁺ sinusoidaalisten endoteelisolujen populaatiosta eri ikäpisteissä. (C) Esimerkkikuva Sony SH800 solulajittelu -laitteen populaatioiden rajauksesta solujen keräämisen aikana.

3.3.2 RNA:n eristys ja cDNA-synteesi

Lajittelevalla virtausytometrillä lajiteltiin ja kerättiin talteen LYVE-1⁺ CD31⁺ ja LYVE-1⁺ solut koko maksan solususpensiosta. Lajitteluun kerättiin aina yhden pentueen kaikki maksat, joiden solususpensiot sekoitettiin keskenään. Solujen kerääminen oli hidasta eikä jokaisessa ikäpisteessä koko solumäärää pystytty lajittelemaan. Kuvasta 20 nähdään,

kuinka paljon soluja saatiin kerättyä eri ikäpisteissä. E12,5 ikäisten alkoiden kymmenestä maksasta saatiin kerättyä yhteensä 3007 solua. E15,5 ikäisistä alkioista kerättiin arviolta viiden maksan verran sinusoidaalisia endoteelisoluja eli 5048 solua ja E17,5 ikäisistä alkioista arviolta yhden maksan verran eli 4599 solua. Kerätyistä soluista eristettiin RNA ja pitoisuus määritettiin NanoDrop-spektrofotometrillä. RNA:n pitoisuus vaihteli näytteissä 10–32 ng/μl eli yhteensä 20 μl:n näytteissä oli RNA:ta 200–640 ng. RNA:n puhtautta mittaavaa absorbanssisuhde 260/280 vaihteli 1,4–3,0 ja absorbanssisuhde 260/230 0,05–0,3. RNA käännettiin cDNA:ksi ja lähetettiin yksisolusekvensoitavaksi.



Kuva 20. Talteen kerättyjen LYVE-1⁺ yksittäispositiivisten ja LYVE-1⁺ CD31⁺ tuplapositiivisten solujen määrä eri ikäpisteissä. Lajittelevalla virtausytometrillä lajiteltiin ja kerättiin talteen Alkion maksan heterogeenisestä solususpensiosta sinusoidaaliset endoteelisolut (LYVE-1⁺ CD31⁻, LYVE-1⁺ CD31⁺).

4. POHDINTA

4.1 Plvap säätelee alkio kautisten monosyyttien kulkua maksan endoteelin läpi

Kudoskohtaisten makrofagien kehityksessä keskeisessä tehtävässä on alkion maksa, jossa monosyyttejä alkaa muodostua alkion hematopoieesissa alkio päivästä 12,5 lähtien (Hoeffel ym. 2015). Maksasta monosyytit siirtyvät verenkierron mukana elimistön muihin kudoksiin, joissa ne erilaistuvat makrofageiksi ja muodostavat kudoskohtaisia populaatioita (Gomez Perdiguero ym. 2015, Hoeffel ym. 2015, Naito ym. 1990). Rantakarin ryhmä on tutkinut kudoskohtaisten makrofagien alkuperää ja osoittanut, että alkion maksan endoteeli säätelee alkio aikaisten monosyyttien kulkua kudoksiin sinusoidaalisten endoteelisolujen aukkojen, fenestroiden, kautta, joita peittää Plvap-proteiinikalvo (Rantakari ym. 2016).

On osoitettu, että Plvap-puutteisilla hiirillä fenestrat jäävät avoimiksi, jolloin alkio kautisten monosyyttien soluliikenne häiriintyy (Rantakari ym. 2016). Plvap-puutteisilla hiirillä havaittiin esiintyvän merkittävästi vähemmän alkion maksan monosyyteistä peräisin olevia kudoskohtaisia makrofageja useissa kudoksissa, kuten pernassa, keuhkoissa, imusolmukkeissa, vatsaontelossa ja paksusuolella. Ruskuaispussista ja luuytimeistä peräisin olevat kudoskohtaiset makrofagit esiintyivät kuitenkin normaalisti. Kaveoli-puutteisilla hiirillä makrofagien vähentymistä ei havaittu, eikä puutos vaikuttanut Plvap-proteiinin ilmentymiseen, mikä vahvistaa käsitystä Plvap-proteiinin vaikutuksesta monosyyttien liikenteeseen (Rantakari ym. 2015).

Plvap ohjaa siis alkio kautisten monosyyttien kudosspesifistä kulkua sinusoidaalisten endoteelisolujen läpi vuorovaikutuksessa muiden molekyylien kanssa, mutta nämä vuorovaikutukset ovat vielä tuntemattomia. Tähän mennessä sinusoidaalisten endoteelisolujen tutkiminen on keskittynyt sairauksien syntymiseen, sillä niiden toimintahäiriöiden tiedetään olevan yhteydessä useisiin maksan sairauksiin (Gracia-Sancho ym. 2021). Tässä työssä tarkoituksena oli optimoida menetelmiä sinusoidaalisten endoteelisolujen tutkimiseksi ja havainnoida Plvap-proteiinin ilmenemistä. Selvittämällä sinusoidaalisten endoteelisolujen, Plvap-proteiinin ja monosyyttien välisiä vuorovaikutuksia päästään lähemmäs kudoskohtaisten makrofagien alkuperän ja toiminnan ymmärtämistä. (Rantakari ym. 2016).

4.1.1 Whole mount -värjäykset

Immunofluoresenssivärjäys on keskeinen solubiologinen menetelmä proteiinien tutkimisessa. Tietyin proteiinin esiintyminen ja sijainnin selvittäminen kudoksessa tarjoaa tärkeää tietoa sen biologisista toiminnoista. Yksi tämän Pro gradu -tutkielman tarkoitus oli whole mount -värjäysprotokollan optimointi niin, että fluoresoivilla vasta-aineilla kyetään osoittamaan maksan sinusoidaalisia endoteelisolujen sekä P1vap-proteiinin sijainti. Tavoitteena oli varmistaa, että spesifisillä vasta-aineilla värjätyt, virtausytometriassa analysoitavat ja kerättävät solut ovat varmasti sinusoidaalisia endoteelisoluja. Whole mount -värjäyksiin käytettiin maksoja alkio päivästä 12,5 syntymään (P0) asti, joten alkion kehityksen aikana tapahtuvia muutoksia maksan sinusoidaalisissa kyettiin hyvin havainnoimaan. Ensimmäiseksi ikäpisteeksi valittiin alkio päivä 12,5, jolloin alkion monosyytit eivät vielä ole lähteneet siirtymään maksasta kudoksiin.

Whole mount -menetelmän optimointi on oleellista, jotta menetelmällä saavutetaan sen tavoite eli luotettavien tulosten ja korkealaatuisten mikroskooppikuvien saaminen alkiorakenteista, mikä mahdollistaa kattavan analyysin alkiokehityksen aikana tapahtuvista tapahtumista (Sbalzarini 2016). Pasternak ym. (2015) todensivat, että toimivan protokollan avulla koe pystytään toistamaan luotettavasti ja varmistetaan, että käytettävät aineet toimivat halutusti. Tässä pro gradu -työssä tavoitteena oli optimoida maksakudoksen käsittely, toimivat vasta-aineet ja konsentraatiot käytettäville aineille. Sinusoidaalisten endoteelisolujen markkeerina käytettiin anti-LYVE-1 vasta-ainetta ja vaskulaaristen endoteelisolujen markkeerina anti-CD31 vasta-ainetta. Endoteelisolumarkkeerien lisäksi värjäyksissä käytettiin P1vap-proteiiniin sitoutuvaa anti-P1vap MECA-32 vasta-ainetta.

Sinusoidaaliset endoteelisolut voidaan erottaa muista maksan soluista markkeerien avulla, sillä solut ilmentävät keskenään erilaisia antigeeneja. LYVE-1 (*engl.* Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1) on hyaluronihappoa sitova tyypin I solukalvon integraalinen glykoproteiini, joka tunnistettiin ensimmäisenä imusuonten endoteelistä (Banerji ym. 1999). Sitä esiintyy useiden elinten ja alkion verisuonten endoteelisoluissa (Pandey ym. 2020, Sheng ym. 2015). Maksassa LYVE-1:n on todettu esiintyvän sinusoidaalisissa endoteelisoluissa sekä alkioilla joissakin maksan makrofageissa (Carreira ym. 2001, Lim ym. 2018). LYVE-1:n ei ole havaittu esiintyvän muissa maksan soluissa, joten sitä voidaan käyttää spesifisenä sinusoidaalisten endoteelisolujen markkeerina (Kato ym. 2006). CD31 (*engl.* Cluster of Differentiation

31) eli PECAM-1 (*engl.* Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) on verisuonten endoteelisolumarkkeri ja adheesiomolekyyli, joka osallistuu endoteelisolujen välisten adheesioiden välittämiseen (Albelda ym. 1991). Lisäksi sitä esiintyy leukosyyteissä ja alkiolla hematopoeettisissa kantasoluissa (Baumann ym. 2004). Maksassa sekä vaskulaariset että lymfaattiset endoteelisolut ilmentävät CD31:tä (DeLeve & Maretti-Mira 2017), joten sitä voidaan käyttää spesifisenä maksan endoteelisolujen markkeerina.

Alkion maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen värjäys anti-LYVE-1-vasta-aineella onnistui hyvin koko ikäsarjassa eikä LYVE-1 ilmentynyt muissa maksan soluissa. Tulos oli odotusten mukainen, sillä sinusoidaalisten endoteelisolujen on todettu ilmentävän LYVE-1-reseptoria, eikä sitä ole havaittu esiintyvän muissa maksan soluissa aikuisella hiirellä (Carreira ym. 2001). Ikäsarjan avulla havaittiin, että sinusoidit kehittyvät alkionkehityksen aikana laajemmaksi ja haaroittuneemmaksi verkostoksi.

Vaskulaarisiin endoteelisoluihin sitoutuvana vasta-aineena käytettiin anti-CD31 vasta-ainetta. Ajanpuutteen vuoksi kokonaista ikäsarjaa ei kuitenkaan ehditty toteuttaa. 17,5 päivän ikäisen alkion maksan vaskulaaristen endoteelisolujen värjäys anti-CD31 vasta-aineella onnistui hyvin. CD31 ilmentyi sinusoidaalisten endoteelisolujen lisäksi suurempien verisuonten endoteelissa eli kaikissa maksan vaskulaarisissa endoteelisoluissa. CD31:tä ilmentyi selkeästi enemmän suurten suonten endoteelissa. Tulos on linjassa aiempiin tutkimuksiin, sillä CD31:n on todettu ilmentyvän enemmän maksan portaalilaskimossa ja maksavaltimossa kuin sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa koko alkionkehityksen ajan (Dingle ym. 2018, Sugiyama ym. 2010).

Plvap-proteiinin värjäminen MECA-32 vasta-aineella oli haastavaa, mutta onnistui lopulta suoralla menetelmällä. Plvap-proteiinin havaittiin ilmentyvän LYVE-1⁺ soluissa, mutta kaikissa LYVE-1⁺ sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa sitä ei esiintynyt. Kuvista ei analysoitu erikseen LYVE-1:n ja MECA-32:n kolokalisaatiota, mutta Plvap ilmentyi pistemäisenä rakenteena sinusoidien endoteelissa. Tulos eroaa Auvisen ym. (2019) tutkimuksesta, jossa mikroskooppisissa analyyseissa Plvap:in havaittiin ilmentyvän kaikissa sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa ennen syntymää sekä syntymään jälkeen. Whole mount -värjäyksissä Plvap-proteiinin ei havaittu ilmentyvän muissa maksan soluissa kuin sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa, mikä tukee aiempia havaintoja Plvap:n ilmentymisestä (Auvinen ym. 2019).

Plvap-proteiinin ilmentymisestä maksan sinusoidaalisisissa endoteelisoluissa eri ikäisillä hiirillä on saatu ristiriitaisia ja vaihtelevia tuloksia (Herrnberger ym. 2014, Stan 2007,

Wang ym. 2014). Whole mount värjäyksissä Plvap-proteiinia havaittiin ilmentyvän koko alkionkehityksen ajan, mikä on linjassa Auvisen ym. (2019) tutkimukseen, jossa Plvap ilmentyi sinusoidaalisten endoteelisolujen fenestroissa koko alkionkehityksen ajan. Aiemman käsityksen mukaan Plvap ilmentyy yksinomaan fenestroiden kalvoissa, jotka häviävät syntymän jälkeen (Rantakari ym. 2016). Auvinen ym. (2019) toteuttivat kuitenkin ikäsarjan alkiopäivästä 12,5 viikkoon 11 asti ja todistivat mikroskooppisilla sekä mRNA-analyysillä Plvap-proteiinin ilmentymisen myös syntymän jälkeen sinusoidaalisten endoteelisolujen solukalvolla.

Suurimpana haasteena whole mount -värjäyksissä oli tekniikan hitaus ja optimointiin kuluikin paljon aikaa. Whole mount -värjäys on melko haastava menetelmä, mutta muihin immunohistokemiallisiin värjäyksiin verrattuna sen etuna on paksut kudokset tai kokonaiset kudokset, jolloin niitä voidaan kuvata kolmiulotteisesti. Parafiini- ja jääleikkeet ovat yleensä 5–40 µm:n paksuisia, kun whole mount -värjäyksissä käytettiin 300–500 µm:n paksuisia kudokset. Menetelmän käyttö oli perusteltua, sillä maksan sinusoidien morfologiaa haluttiin kuvata kolmiulotteisesti. Suurten ja paksujen kudosten käsittely vaatii kuitenkin pitkiä inkubaatioaikoja, jotta fiksaatiivi, blokkauksuspuri, vasta-aineet ja pesunesteet pääsevät kudoksen sisään. Kahden vasta-aineen värjäyksissä aikaa kului lähes viikko, jonka jälkeen näytteet kuvattiin ja analysoitiin, jolloin saatiin selville toimivatko vasta-aineet ja kudoksen käsittely. Kudosten käsittelyä ja vasta-aineiden pitoisuuksia jouduttiin optimoimaan useaan kertaan, joten värjäysprotokolla käytiin läpi monesti. Useamman vasta-aineen värjäyksiä voisi nopeuttaa suoralla menetelmällä, mutta haasteena on usein heikompi signaali. Whole mount -värjäyksissä emme saaneet suoralla menetelmällä värjäyksiä onnistumaan nimenomaan signaalin heikkouden takia, joten kaikki alkion maksan värjäykset tehtiin lopulta epäsuoralla menetelmällä.

4.1.2 Virtausytometria ja lajitteleva virtausytometria

Tässä Pro gradu -tutkimuksessa karakterisoitiin vasta-aineiden avulla hiiren alkion maksan sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyyppiä virtausytometrialla. Lisäksi lajittelevalla virtausytometrillä lajiteltiin ja kerättiin talteen sinusoidaaliset endoteelisolut heterogeenisestä solususpensiosta. Käytettävien vasta-aineiden toimivuus todennettiin whole mount -värjäyksillä ja virtausytometrialla, jolloin saatiin kerättyä halutut solut. Virtausytometria on nykyään yleisesti käytetty ja nopea menetelmä solujen ominaisuuksien tutkimiseksi, mutta vaatii optimointia luotettavien tulosten saamiseksi.

Ennen virtausytometriaa kudokset tulee hajottaa yksisolususpensioksi, solut värjätä fluoresoivilla vasta-aineilla tietyn paneelin mukaan ja optimoida virtausytometrilaitteen asetukset ennen ajoa.

Kun kudokset hajotetaan yksisolususpensioksi, on tärkeää, että solut pysyvät elinvoimaisina eikä niiden ilmiäisy muutu. Tämä on usein haastavaa, joten on tärkeää optimoida solujen käsittelyprotokolla sekä virtausytometriassa käytettävät reagenssit ja vasta-aineet hyvin (Meyer ym. 2016). Tässä Pro gradu -tutkimuksessa maksakudoksen hajotuksen ja käsittelyn optimointi yksisolususpensioksi oli tärkeää, sillä sinusoidaalisten endoteelisolujen määrä on pieni eikä niitä haluttu menettää. Maksa on yksi elimistön suurimmista elimistä, mutta esimerkiksi 12,5 päivän ikäisellä alkioilla maksa on hyvin pieni aikuisen hiiren verrattuna.

Vasta-ainepaneelit optimoidaan sen mukaan, mitä soluja halutaan tutkia. Sinusoidaaliset endoteelisolut voidaan erotella muista maksan soluista endoteelisolumarkkeerien LYVE-1 ja CD31 avulla. Solut tuplavärjättiin, sillä alkion maksassa esiintyy myös LYVE-1⁺ makrofageja, joita ei haluttu tutkia (Carreira ym. 2001). Lajittelevaan virtausytometriaan solut värjättiin lisäksi linjamarkkereilla, jotta päästiin eroon T-lymfosyyteistä (CD3), hematopoieettisista soluista (CD45) ja leukosyyteistä (CD11b). Whole mount -värjäyksillä todettiin käytettävien vasta-aineiden sitoutuvan spesifisesti haluttuihin soluihin.

Virtausytometrinen analyysi perusteella havaittiin, että LYVE-1⁺ CD31⁺ solujen eli sinusoidaalisten endoteelisolujen osuus maksan soluista vaihteli 0,2–1,2 %, mikä tukee oletusta siitä, että kyseessä on hyvin pieni solupopulaatio. Solujen määrä on linjassa aiempaan tutkimukseen, jossa virtausytometrinen analyysi mukaan 4±2,6 % alkion maksan sinusoidaalisista ilmensi endoteelisolumarkkereita LYVE-1 ja CD31 (Cañete ym. 2017). Sinusoidaalisten endoteelisolujen osuudessa oli jonkin verran vaihtelua eri ikäpisteiden välillä. Solujen osuus kasvoi ensin alkio päivästä 12,5 alkio päivään 15,5 ja lähti sitten vähenemään kohti syntymää. Tulos on kiinnostava, sillä maksan koko ja siten solumäärä kasvaa, joten sen perusteella sinusoidaalisten endoteelisolujen osuuden olisi voinut ajatella kasvavan syntymään asti. Tämän tutkimuksen perusteella maksan koon kasvu kuitenkin lisää muiden maksan solujen kuin sinusoidaalisten endoteelisolujen osuutta. Aiempaa tutkimustietoa sinusoidaalisten endoteelisolujen määrästä eri alkionkehityksen vaiheissa ei ole, joten tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa onko vaihtelulla biologista merkitystä.

Virtausytometrinen analyysi mukaan kaikissa ikäpisteissä keskimäärin noin puolet sinusoidaalista endoteelisoluista ilmensi Plvap-proteiinia. Plvap-proteiinia ilmentävien (MECA-32⁺) solujen osuus LYVE-1⁺ CD31⁺ soluista pysyi melko tasaisena koko alkion kehityksen ajan alkionpäivästä 12,5 syntymään asti. Ainoa merkitsevä ero oli 17,5 ikäisellä alkionpäivällä, jolla MECA32⁺ solujen osuus LYVE-1⁺ CD31⁺ soluista oli yli 60 %. Vastaavasti MECA-32⁻ soluja oli joka ikäpisteessä keskimäärin puolet sinusoidaalista endoteelisoluista. Merkitsevä ero oli ikäpisteessä 17,5, jossa MECA32⁻ solujen osuus on alle 40 %. Aiempaa tutkimustietoa myöskään Plvap-proteiinin ilmentymisestä sinusoidaalissa endoteelisoluissa alkionkehityksen aikana ei ole, joten on tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa millainen biologinen merkitys vaihtelulla on.

Plvap-proteiinia ilmentävien solujen määrässä per maksa esiintyi jonkin verran vaihtelua eri ikäpisteissä. MECA32⁺ solujen määrän kuvaaja noudatti samaa kaavaa kuin LYVE-1⁺ CD31⁺ solujen kuvaaja, eli ikäpisteessä 12,5 Plvap-proteiinia ilmentäviä soluja oli hyvin vähän ja niiden määrä kasvoi 15,5 päivään asti, jonka jälkeen määrä pieneni merkitsevästi. MECA32⁻ solujen määrä puolestaan nousi merkitsevästi alkionpäivästä 12,5 alkionpäivään 17,5 ja määrä pieneni vasta vastasyntyneellä (P0). Tulos vahvistaa Plvap-proteiinin ilmentymisen nimenomaan maksan sinusoidaalissa endoteelisoluissa koko alkionkehityksen ajan. Kaikissa sinusoidaalissa endoteelisoluissa sitä ei kuitenkaan esiinny, mikä todettiin myös whole mount -värjäyksissä.

Virtausytometriassa haasteena on kompensatioasetukset. Vasta-aineisiin liitetyt fluorokromit emittoivat valoa eri aallonpituuksilla ja muodostavat spektrin, jolloin osa aallonpituuksista menee päällekkäin. Eri fluorokromien kanavissa on valittuna mitattava aallonpituus, mutta päällekkäisyyttä tapahtuu silti ja kanaviin vuotaa toisten fluorokromien valoa. Kompensatioasetusten avulla on tarkoitus huomioida aallonpituuksien päällekkäisyys laskemalla kompensatioprosenttien avulla todellinen signaali. Laittevalmistajat ohjeistavat kompensatioasetusten tekemisessä (BD Biosciences 2021), mutta lopulta tutkija itse määrittää ne. Päällekkäisyyttä voidaan välttää myös valitsemalla fluorokromeja, joiden spektrit eivät mene päällekkäin. Virtausytometriassa luotettavuudessa on tärkeää, että laitteet toimivat oikein ja ovat kunnossa. Laitteissa seurataan tiettyjä parametreja kompensatio- ja kalibraatiohelmien avulla ja kompensatioasetuksia voidaan tarkastaa ja muokata toistettavuuden säilyttämiseksi. Huollettaessa asetukset voivat kuitenkin muuttua ja esimerkiksi kompensatioasetukset voidaan joutua tekemään uudestaan, jolloin ne ole enää täysin samanlaiset kuin aiemmin. (Bio-Rad 2022).

Virtaussytometrisissa analyyseissä haasteena on lisäksi solupopulaatioiden rajaaminen. Tutkija päättää miten rajaukset tehdään, joten rajaukset pitää tehdä samalla tavalla jokaisessa kokeen toistossa, jotta tulokset ovat luotettavia. Tässä Pro gradu - tutkimuksessa rajaukset tehtiin tuloksissa esitetyn kaavan mukaan jokaisessa toistossa. Jokaisessa ikäpisteessä koe toistettiin 2–3 kertaa ja yhdessä toistossa käytettiin 4–9 maksaa, joten otanta oli hyvä. Haasteena oli tutkittavien solujen pieni määrä, sillä alle 3 % maksan soluista on sinusoidaalisia endoteelisoluja.

Lajittelevalla virtaussytometrillä saatiin lajiteltua heterogeenisestä solususpensiosta 3000–5000 sinusoidaalista endoteelisolua per ikäpiste. Määrä on hyvä, sillä yleensä yksisolusekvensointiin tarvitaan 500–10 000 solua. Lajitelluista soluista eristettiin RNA, mikä käännettiin cDNA:ksi ja lähetettiin yksisolusekvensoitavaksi. Saadun RNA:n puhtaus ja määrä oli riittävä. Yleensä RNA:n kokonaismäärän tulisi olla 100–1000 ng ja tässä työssä sinusoidaalisista endoteelisolusta eristetyn RNA:n määrä vaihteli 200–640 ng. Yksisolusekvensointi ja geenidatan analysointi ei enää kuulu tähän Pro gradu – tutkielmaan.

Haasteena lajittelevassa virtaussytometriassa oli menetelmän hitaus. Saman päivän aikana kudokset tulee kerätä, hajottaa solususpensioksi, värjätä vasta-aineilla ja lajitella. Sinusoidaalisten endoteelisolujen vähäisen määrän takia lajittelu muista maksan soluista oli hidasta. Solujen lajittelussa on tärkeää, että solususpensiossa ei ole liikaa soluja suhteessa puskuriliuokseen eikä solut liimautuisi toisiinsa ja siten tukkisi laitetta, joten solususpensiota piti ajoittain laimentaa puskuriliuoksella ja vorteksoida lajittelun aikana.

4.2 Jatkotutkimus

Tulevaisuudessa tarkoituksena on selvittää, miten Plvap säätelee monosyyttien kulkua, miksi Plvap-poistogeenisillä hiirillä monosyyttien kulkeutuminen maksasta alkioaikana estyy, millaisia molekulaarisia vuorovaikutuksia solujen sekä molekyylien välillä on ja mitä muutoksia sinusoidaalisissa endoteelisolussa tapahtuu alkionkehityksen aikana. Rantakari ym. (2016) ovat tutkineet Plvap-proteiinin interaktioita joidenkin molekyylien kanssa ja havainneet Plvap:n sitoutuvan hepariinia sisältäviin helmiin. Monet kemotaktiset molekyylit, jotka säätelevät monosyyttien ja makrofagiin liikennettä aikuisilla, vuorovaikuttavat nimenomaan hepariinin kanssa. Auvinen ym. (2019) havaitsivat myöhemmin hepariinia sitovien molekyylien, VEGF-A- ja neuropilin1-reseptorien, välisiä vuorovaikutuksia Plvap-fuusioproteiinin kanssa.

Rantakarin tutkimusryhmän tavoitteena on jatkaa tutkimista erilaisten *in vitro* -kokeiden avulla ja selvittää, mitkä molekyylit vuorovaikuttavat keskenään alkion monosyyttien, sinusoidaalisten endoteelisolujen sekä Plvap-proteiinin välillä. Tarkoituksena on lajitella virtaussytometrillä Plvap-poistogeenisten hiirten eri ikäisten alkioiden maksasta sinusoidaalisia endoteelisoluja tässä työssä optimoidun protokollan mukaan. Tällöin pystytään vertailemaan normaalisti Plvap-proteiinia ilmentävien villityypin ja poistogeenisten hiirten sinusoidaalisissa endoteelisoluissa ilmentyvien geenien eroja ja saadaan tietoa sinusoidaalisten endoteelisolujen kehityksestä transkriptomitasolla yksisolusekvennoinnista saadun datan avulla. Tulevaisuudessa geenitiedon avulla voidaan selvittää sinusoidaalisten endoteelisolujen ja maksan monosyyttien välisiä vuorovaikutuksia geeniekspressiotasolla ja saada tietoa mekanismeista, jotka voisivat olla osallisena monosyyttien kulkeutumisessa. Eri molekyylien ilmentymistä kudostasolla voidaan testata esimerkiksi tässä työssä optimoiduilla whole mount -värjäyksillä käyttämällä uusia vasta-aineita.

4.3 Tutkimuksen merkitys

Kudoskohtaisten makrofagien alkuperää ja toimintaa on tutkittu jo pitkään. Alun perin makrofagien ajateltiin olevan peräisin luuytimessä muodostuvista verenkierrossa kiertävistä monosyyteistä (van Furth & Cohn 1968, Volkman & Gowans 1965), mutta nykyään makrofageja tiedetään muodostuvan jo alkioaikana. Makrofagit jaetaan alkionkehityksen aikana muodostuviin kudoskohtaisiin makrofageihin ja syntymän jälkeen luuytimen monosyyteistä erilaistuviin tulehdusperäisiin makrofageihin (Gomez Perdiguero ym. 2015). Ensimmäiset makrofagit kehittyvät ruskuaispussissa ja leviävät verenkierron mukana kaikkiin kudoksiin (Hoeffel ym. 2015). Myöhemmin monosyyttituotanto hematopoieettisista kantasoluista keskittyy alkion maksaan, ja näistä erilaistuvat makrofagit korvaavat suurimmassa osassa kudoksia ruskuaispussista peräisin olevat makrofagit (Sheng ym. 2015). Syntymän jälkeen monosyyttituotanto siirtyy luuytimeen. Tulehduksessa nämä monosyytit voivat tuottaa mihin tahansa kudokseen tulehdusperäisen makrofagipopulaation (Epelman ym. 2014, Salmi 2017).

Alkioperäiset makrofagit ovat pitkäikäisiä soluja, jotka kykenevät uusiutumaan ja jakautumaan ja säilyvät useissa kudoksissa läpi elämän (Merad ym. 2002, Sieweke ym. 2013). Kudoskohtaiset makrofagit vaikuttavat kudosten kehitykseen ja toimintaan, mikä on havaittu esimerkiksi maitorauhasessa ja kiveksissä, joissa makrofagipopulaatioiden

havaittiin olevan alkioperäisiä ja vaikuttavan kiveksen spermatogeneesiin sekä maitorauhasen kehittymiseen (Jäppinen ym. 2019, Lokka ym. 2020). Makrofagit liittyvät moniin elimistön toimintoihin, kuten immuunivasteeseen, kudosten kehitykseen ja homeostasiaan sekä eri sairauksien syntymiseen, joten on tärkeää ymmärtää kudskohtaisten makrofagien alkuperä ja niiden kulkeutumiseen vaikuttavat mekanismit. Makrofageista tiedetään lopulta vielä hyvin vähän, joten tutkittavaa riittää pitkään.

4.4 Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa tavoitteena oli optimoida hiiren alkion maksan verisuoniston endoteelisolujen immunofluoresenssivärjäys whole mount -menetelmällä ja osoittaa vasta-aineiden spesifinen sitoutuminen haluttuihin soluihin. Sinusoidaalisten endoteelisolujen ja vaskulaaristen endoteelisolujen värjäys onnistui hyvin eikä vasta-aineiden sitoutumista ei-vaskulaarisiin soluihin havaittu. Ikäsarjan avulla havainnoitiin maksan verisuonistoa, joka kehittyi haaroittuneemmaksi ja laajemmaksi alkionkehityksen aikana. Plvap-proteiinin ilmentyminen paikantui sinusoidaalsiin endoteelisoluihin, mikä vahvisti aiempia havaintoja sen ilmentyvän LYVE-1⁺ endoteelisoluissa.

Toisena tavoitteena oli optimoida hiiren alkion maksan käsittely virtausytometrisiin analyyseihin ja karakterisoida sinusoidaalisten endoteelisolujen fenotyyppi sekä kerätä talteen sinusoidaaliset endoteelisolut heterogeenisestä solususpensiosta. Virtausytometrysten analyysien perusteella alle 1 % alkion maksan soluista on sinusoidaalisia endoteelisoluja ja keskimäärin noin puolet sinusoidaalisista endoteelisoluista ilmensi Plvap-proteiinia. Sinusoidaalisten endoteelisolujen ja siten Plvap-proteiinia ilmentävien solujen määrä vaihteli kuitenkin eri ikäpisteissä solumäärän kasvaessa alkiopäivän 12,5 jälkeen ja vähentyen ennen syntymää.

Alkion sinusoidaalisia endoteelisoluja on tutkittu aiemmin hyvin vähän ja tavoitteena oli saada eristettyä niitä lajittelevalla virtausytometrillä eri ikäisten alkioiden maksasta yksisolusekvensointia varten. Kyseessä on hyvin pieni solupopulaatio verrattuna muihin maksan soluihin, joten haasteena oli solujen vähäinen määrä. Jokaisesta halutusta ikäpisteestä saatiin kuitenkin eristettyä tarpeeksi soluja, joista eristettiin RNA ja käännettiin cDNA:ksi ennen yksisolusekvensointia.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani Heidi Gerkeä ja Pia Rantakaria asiantuntevasta ohjaamisesta ja tämän Pro gradu -työn mahdollistamisesta sekä koko Rantakarin tutkimusryhmää kaikista opeista, avusta ja kannustuksesta. Kiitokset myös Turku Biosciencen The Cell Imaging and Cytometry (CIC) Core -yksilön henkilökunnalle virtausytometrin ja konfokaalimikroskoopin käytön perehdytyksestä. Kiitän ohjaajaani Tiina Henttistä kannustavasta ohjauksesta ja avusta tutkielman parissa. Kiitos perheelle, ystäville ja opiskelukavereille kaikesta tuesta ja avusta projektin aikana. Kiitos myös rakkaalle koiranpennulle, jonka ansioista päiviin on mahtunut kirjoittamisen lisäksi paljon liikuntaa ja leikkiä.

LÄHTEET

Adams DH, Eksteen B (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 6, 244–451.

Auvinen K, Lokka E, Mokkalä E, Jäppinen N, Tyystjärvi S, Saine H, Peurla M, Shetty S, Elima K, Rantakari P, Salmi M (2019). Fenestral diaphragms and PLVAP associations in liver sinusoidal endothelial cells are developmentally regulated. *Scientific Reports* 9, 15698.

Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AMI (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology* 15, 929–937.

Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *Journal of Cell Biology* 144, 789–801.

Baumann CI, Bailey AS, Li W, Ferkowicz MJ, Yoder MC, Fleming WH (2004). PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood* 104, 1010–1016.

BD Biosciences (2022). Procedure for Manual Setting of Compensation for Multi-Color Flow Cytometric Analysis <<https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/protocols/setting-compensation-multicolor-flow>> [Luettu 22.1.2022]

Bio-Rad (2022). Fluorescence Compensation. <<https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fluorescence-compensation.html>> [Luettu 5.2.2022]

Braet F, Wisse E (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: A review. *Comparative Hepatology* 1, 1.

Cañete A, Comaills V, Prados I, Castro AM, Hammad S, Ybot-Gonzalez P, Bockamp E, Hengstler JG, Gottgens B, Sánchez MJ (2017). Characterization of a Fetal Liver Cell Population Endowed with Long-Term Multiorgan Endothelial Reconstitution Potential. *Stem Cells* 35, 507–521.

Carreira CM, Nasser SM, Tomaso E di, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain RK (2001). LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: Expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Research* 61, 8079–8084.

Couvelard A, Scoazec JY, Dauge MC, Bringuier AF, Potet F, Feldmann G (1996). Structural and functional differentiation of sinusoidal endothelial cells during liver organogenesis in humans. *Blood* 87, 4568–4580.

DeLeve LD, Maretti-Mira AC (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Seminars in Liver Disease* 37, 377–387.

Dingle AM, Yap KK, Gerrand YW, Taylor CJ, Keramidaris E, Lokmic Z, Kong AM, Peters HL, Morrison WA, Mitchell GM (2018). Characterization of isolated liver sinusoidal endothelial cells for liver bioengineering. *Angiogenesis* 21, 581–597.

- Elkadri A, Thoeni C, Deharvengt SJ, Murchie R, Guo C, Stavropoulos JD, Marshall CR, Wales P, Bandsma RHJ, Cutz E, Roifman CM, Chitayat D, Avitzur Y, Stan R v., Muise AM (2015). Mutations in Plasmalemma Vesicle Associated Protein Result in Sieving Protein-Losing Enteropathy Characterized by Hypoproteinemia, Hypoalbuminemia, and Hypertriglyceridemia. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1, 381–394.
- Ema H, Nakauchi H (2000). Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95, 2284–8.
- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35.
- Fan X, Zhang H, Cheng Y, Jiang X, Zhu J, Jin T (2016). Double Roles of Macrophages in Human Neuroimmune Diseases and Their Animal Models. *Mediators of Inflammation*, 8489251.
- Ficht X, Iannacone M (2020). Immune surveillance of the liver by T cells. *Science Immunology* 5, 51.
- Fujiwara N, Kobayashi K (2004). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 4: 2816.
- Furth R van, Cohn ZA (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 128, 415–435.
- Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology* 12, 1035–1044.
- Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola HKA (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental Cell* 8, 365–375.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Golub R, Cumano A (2013). Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 51, 226–231.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, Bruijn MF de, Geissmann F, Rodewald HR (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Gordon S, Plüddemann A (2017). Tissue macrophages: Heterogeneity and functions. *BMC Biology* 15, 53.
- Gracia-Sancho J, Caparrós E, Fernández-Iglesias A, Francés R (2021). Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 18, 411–43.

Hakonen E, Toivonen S, Jalanko H, Otonkoski T (2014). Human stem cells in the treatment of pancreatic and hepatic diseases. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 130, 1973–80.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, Rooijen N van, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.

Herrnberger L, Hennig R, Kremer W, Hellerbrand C, Goepferich A, Kalbitzer HR, Tamm ER (2014). Formation of fenestrae in murine liver sinusoids depends on plasmalemma vesicle-associated protein and is required for lipoprotein passage. *PLoS ONE* 9, 115005.

Herrnberger L, Seitz R, Kuespert S, Bösl MR, Fuchshofer R, Tamm ER (2012). Lack of endothelial diaphragms in fenestrae and caveolae of mutant Plvap-deficient mice. *Histochemistry and Cell Biology* 138, 709–24.

Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Larbi A, Ng LG, Chan JKY, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F (2015). C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 42, 665–78.

Jäppinen N, Félix I, Lokka E, Tyystjärvi S, Pynttäre A, Lahtela T, Gerke H, Elima K, Rantakari P, Salmi M (2019). Fetal-derived macrophages dominate in adult mammary glands. *Nature Communications* 10, 281.

Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, Hoepfner MP, Du ZG, Paulsen M, Rosenstiel P, Senger P, Hofmann-Apitius M, Keller A, Kupcinskas L, Franke A, Hemmrich-Stanisak G (2017). A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Research* 45, 9290–9301.

Kasaai B, Caolo V, Peacock HM, Lehoux S, Gomez-Perdiguerro E, Luttun A, Jones EAV (2017). Erythro-myeloid progenitors can differentiate from endothelial cells and modulate embryonic vascular remodeling. *Scientific Reports* 7, 43817.

Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M (2006). Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anatomical Science International* 81, 71–83.

Lemaigre FP (2009). Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies. *Gastroenterology* 137, 62–79.

Lewis K, Yoshimoto M, Takebe T (2021). Fetal liver hematopoiesis: from development to delivery. *Stem Cell Research and Therapy* 12, 139.

Lim HY, Lim SY, Tan CK, Thiam CH, Goh CC, Carbajo D, Chew SHS, See P, Chakarov S, Wang XN, Lim LH, Johnson LA, Lum J, Fong CY, Bongso A, Biswas A, Goh C, Evrard M, Yeo KP, Basu R, Wang JK, Tan Y, Jain R, Tikoo S, Choong C, Weninger W, Poidinger M, Stanley RE, Collin M, Tan NS, Ng LG, Jackson DG, Ginhoux F, Angeli V (2018). Hyaluronan Receptor LYVE-1-Expressing Macrophages Maintain Arterial Tone

- through Hyaluronan-Mediated Regulation of Smooth Muscle Cell Collagen. *Immunity* 49, 326–341.
- Lokka E, Lintukorpi L, Cisneros-Montalvo S, Mäkelä JA, Tyystjärvi S, Ojasalo V, Gerke H, Toppari J, Rantakari P, Salmi M (2020). Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. *Nature Communications* 11, 4375.
- McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J (2003). Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101, 1669–1676.
- Mével R, Draper JE, Lie-A-Ling M, Kouskoff V, Lacaud G (2019). RUNX transcription factors: Orchestrators of development. *Development (Cambridge)* 146, 17.
- Meyer J, Lacotte S, Morel P, Gonelle-Gispert C, Bühler L (2016). An optimized method for mouse liver sinusoidal endothelial cell isolation. *Experimental Cell Research* 349, 291–301.
- Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzakt E (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291–301.
- Naito M, Takahashi K, Nishikawa SI (1990). Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *Journal of Leukocyte Biology* 48, 27–37.
- Oishi Y, Manabe I (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology* 30, 511–528.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–84.
- Pandey E, Nour AS, Harris EN (2020). Prominent Receptors of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Liver Homeostasis and Disease. *Frontiers in Physiology* 11, 873.
- Pasternak T, Tietz O, Rapp K, Begheldo M, Nitschke R, Ruperti B, Palme K (2015). Protocol: An improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* 11, 50.
- Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, Rautou PE (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology* 66, 212–227.
- Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Holroyd EW, Simari RD (2011). Resident vascular progenitor cells-diverse origins, phenotype, and function. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4, 161–176.
- Rantakari P, Auvinen K, Jäppinen N, Kapraali M, Valtonen J, Karikoski M, Gerke H, Iftakhar-E-Khuda I, Keuschnigg J, Umemoto E, Tohya K, Miyasaka M, Elima K, Jalkanen S, Salmi M (2015). The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nature Immunology* 16, 386–396.
- Rantakari P, Jäppinen N, Lokka E, Mokkalala E, Gerke H, Peuhu E, Ivaska J, Elima K, Auvinen K, Salmi M (2016). Fetal liver endothelium regulates the seeding of tissue-resident macrophages. *Nature* 538, 392–396.

- Salmi M (2017). Makrofagit ja syöpä. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 133, 829–837.
- Sbalzarini IF (2016). Seeing is believing: Quantifying is convincing: Computational image analysis in biology. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* 219, 1–39.
- Sevenich L (2018). Brain-resident microglia and blood-borne macrophages orchestrate central nervous system inflammation in neurodegenerative disorders and brain cancer. *Frontiers in Immunology* 9, 697.
- Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382–393.
- Stan R (2007). Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 1, 621–643.
- Stan R, Tse D, Deharvengt SJ, Smits NC, Xu Y, Luciano MR, McGarry CL, Buitendijk M, Nemani K, Elgueta R, Kobayashi T, Shipman SL, Moodie KL, Daghlian CP, Ernst PA, Lee HK, Suriawinata AA, Schned AR, Longnecker DS, Fiering SN, Noelle RJ, Gimi B, Shworak NW, Carrière C (2012). The Diaphragms of Fenestrated Endothelia: Gatekeepers of Vascular Permeability and Blood Composition. *Developmental Cell* 23, 1203–18.
- Stan R, Kubitza M, Palade GE (1999). PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13203–13207.
- Su T, Yang Y, Lai S, Jeong J, Jung Y, McConnell M, Utsumi T, Iwakiri Y (2021). Single-Cell Transcriptomics Reveals Zone-Specific Alterations of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Cirrhosis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11, 1139–1161.
- Sugiyama Y, Takabe Y, Nakakura T, Tanaka S, Koike T, Shiojiri N (2010). Sinusoid development and morphogenesis may be stimulated by VEGF-Flk-1 signaling during fetal mouse liver development. *Developmental Dynamics* 239, 386–397.
- Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, Mesy-Bentley KKL de, Waugh R, Palis J (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* 109, 1433–1441.
- Volkman A, Gowans JL (1965). The origin of macrophages from bone marrow in the rat. *British journal of experimental pathology* 46, 62–70.
- Walter TJ, Cast AE, Huppert KA, Huppert SS (2014). Epithelial VEGF signaling is required in the mouse liver for proper sinusoid endothelial cell identity and hepatocyte zonation in vivo. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 306, 849–862.
- Wang L, Wang X, Xie G, Wang L, Hill CK, DeLeve LD (2012). Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats. *Journal of Clinical Investigation* 122, 1567–1573.

Wang YH, Cheng TY, Chen TY, Chang KM, Chuang VP, Kao KJ (2014). Plasmalemmal Vesicle Associated Protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 14, 815.

Wisse E (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of Ultrastructure Research* 31, 125–150.

Wu Y, Hirschi KK (2021). Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 617879.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.

Xie G, Wang L, Wang X, Wang L, DeLeve LD (2010). Isolation of periportal, midlobular, and centrilobular rat liver sinusoidal endothelial cells enables study of zoned drug toxicity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 299, 1204–1210.

Zaret KS, Grompe M (2008). Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322, 1490–1494.

Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, Becker MS, Zanetta L, Dejana E, Gasson JC, Tallquist MD, Iruela-Arispe ML (2008). Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 625–36.

LIITE

Liuokset:

EPICS PBS

Kaupallinen PBS-tabletti (Gibco, tuotenumero 18912014). Valmistetaan valmistajan ohjeen mukaan 1 tabletti/ 500 ml MilliQ-vettä. Ei steriloida, säilytetään +4 °C:ssa.

EPICS I

40 ml EPICS PBS

0,8 ml FCS (tai FBS)

0,04 ml 4 % NaN₃

EPICS FIX/FACS FIX

20 ml EPICS PBS

0,54 ml 37 % formaldehydi