

# **Hematopoieettisten kantasolujen osoittaminen hiiren kiveksestä**

Laura Lintukorpi

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto  
Biologian laitos

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

LAURA LINTUKORPI: Hematopoieettisten kantasolujen osoittaminen hiiren kiveksessä

Pro gradu -tutkielma, 51 s., 1 liite.

Eläinphysiologia

Syyskuu 2020

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

---

Aikuisen hiiren kiveksen valkosolupopulaatio koostuu pääosin makrofageista, jotka ylläpitävät kiveksen immuunitasapainoa ja osallistuvat kiveksen hormonitoiminnan säätelyyn. Kiveksen makrofagipopulaatio voidaan jakaa kahteen sijainnillisesti ja morfologisesti toisistaan eroavaan populaatioon. Välikudoksen makrofagien on osoitettu olevan sikiökautista alkuperää, ja peritubulaarisen makrofagipopulaation ajatellaan muodostuvan luuytimen tuottamista monosyyteistä. Tämä jako on viimeaikaisten tutkimusten perusteella kyseenalaistettu. Pia Rantakarim ryhmin tutkimuksen mukaan peritubulaariset makrofagit eivät ole peräisin luuytimen monosyyteistä, eikä niiden tarkkaa alkuperää ei vielä tiedetä. Aiemmin on havaittu, että aortta-gonadi-mesonefros-rakenteesta (AGM) peräisin olevia hematopoieettisia kantasoluja on kudoksissa, jotka eivät perinteisesti vastaa hematopoiesista. On siis mahdollista, että AGM-rakenteesta erilaistuvissa kudoksissa, kuten kiveksessä, voisi olla näitä jäännöksellisiä kantasoluja ja että kiveksen makrofagipopulaatio, jonka alkuperä on vielä epäselvä, on erilaistunut kiveksen paikallisista hematopoieettisista kantasoluista.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, onko hiiren kehittyvässä kiveksessä hematopoieettisia kantasoluja. Lisäksi tarkoituksena oli tutkia, ovatko ne myös toiminnallisesti aktiivisia eli kykenevätkö ne esimerkiksi muodostamaan solupesäkkeitä. Hypoteesi oli, että hiiren kiveksessä on paikallinen hematopoieettinen kantasolupopulaatio tai jokin siitä kehittyvistä valkosolujen esiastepopulaatioista. Paikallinen kantasolupopulaatio tarjoaa täysin uuden vaihtoehdon kudskohtaisten makrofagien syntyperälle. Työssä käytettiin vastasyntyneitä ja alkioikäisiä villityypin uroshiiriä, joilta kerättiin kivekset ja tarvittavat kontrollikudokset. Hematopoieettinen kantasolupopulaatio pyrittiin osoittamaan virtausytometrialla, immunohistokemialla ja kantasolujen pesäkkeenkasvatuskokeilla.

Tämän pro gradu -työn tulokset viittaavat siihen, että hiiren kehittyvässä kiveksessä on hematopoieettisia kantasoluja, joista kehittyy kiveksen toinen makrofagipopulaatio. Hematopoieettisia kantasoluja havaittiin hiiren kehittyvässä kiveksessä kaikilla tutkimuksessa käytetyillä metodeilla. Myös hematopoieettisten kantasolujen tai niiden progenitorisolujen toiminnallisuudesta varmistuttiin pesäkkeenkasvatuskokeilla.

AVAINSANAT: kudskohtainen makrofagi, kives, hematopoiesi, hematopoieettinen kantasolu, Sca-1, virtausytometria, immunohistokemiallinen värjäys

# Sisällys

1. JOHDANTO.....	1
1.1 Makrofagit .....	1
1.2 Makrofagien alkuperä ja erilaistuminen.....	3
1.3 Verisolujen muodostuminen eli hematopoieesi .....	4
1.3.1 Sikiökaautinen hematopoieesi ja makrofagien alkuperä.....	4
1.3.2 Aikuisen hematopoieesi .....	6
1.3.3 Luuydinperäisten makrofagien erilaistuminen ja sen säätely .....	9
1.4 Kives.....	11
1.4.1 Kiveksen rakenne .....	11
1.4.2 Kiveksen kantasolut ja spermatogeneesi.....	14
1.4.3 Kiveksen immuunijärjestelmä.....	14
1.4.4 Kiveksen makrofagit ja niiden alkuperä .....	15
1.5 Tutkimuskysymys .....	17
2. MATERIAALIT JA METODIT .....	19
2.1 Hiiret .....	19
2.2 Virtaussytometria .....	20
2.2.1 Kudosten keräys ja käsittely virtaussytometriaa varten .....	20
2.2.2 Solujen vasta-ainevärjäys ja virtaussytometria .....	21
2.3 Pesäkkeenmuodostuskokeet.....	22
2.3.1 Kudosten keräys ja käsittely pesäkkeenmuodostuskoetta varten.....	22
2.3.2 Pesäkkeiden kasvatus ja niiden havainnointi .....	23
2.4 Whole mount -värjäykset .....	24
2.4.1 Tuoreiden whole mount -näytteiden keräys ja käsittely .....	24
2.4.2 Whole mount -näytteiden vasta-ainevärjäykset .....	25
2.4.3 Whole mount -näytteiden kirkastaminen ja kudosten kuvantaminen .....	26
3. TULOKSET .....	28
3.1 Kivesten kantasolupopulaatioiden virtaussytometrinen analyysi .....	28
3.1.1 Virtaussytometrisen analyysiprosessin malli .....	28
3.1.2 Hiiren kehittyvässä kiveksessä on hematopoieettisia kantasoluja .....	29
3.2 Vastasyntyneen hiiren kiveksen pesäkkeenkasvatuskokeet.....	30
3.3 Hematopoieettisten kantasolujen immunohistokemiallinen analyysi .....	33
3.3.1 Kehittyvän kiveksen hematopoiettiset kantasolut.....	33
3.3.2 Vastasyntyneen hiiren kiveksen immunohistokemiallinen analyysi.....	35
3.3.3 Hiiren alkioden AGM-rakenteen ja maksan immunofluoresenssivärjäykset.....	36
4. TULOSTEN TARKASTELU .....	37

4.1 Kudoskohtaisten makrofagien alkuperä yhä epäselvä .....	37
4.2 Hiiren kiveksen makrofagipopulaatiot .....	38
4.2.1 Virtaussytometria .....	38
4.2.2 Pesäkkeenkasvatuskokeet .....	39
4.2.3 Immunohistokemialliset värjäykset .....	41
4.2.4 Hiirten käyttö mallieläimenä on mielekästä mutta myös epävarmaa .....	42
4.3 Yhteenveto .....	43
KIITOKSET .....	45
LÄHTEET .....	46
LIITE .....	51

# 1. JOHDANTO

## 1.1 Makrofagit

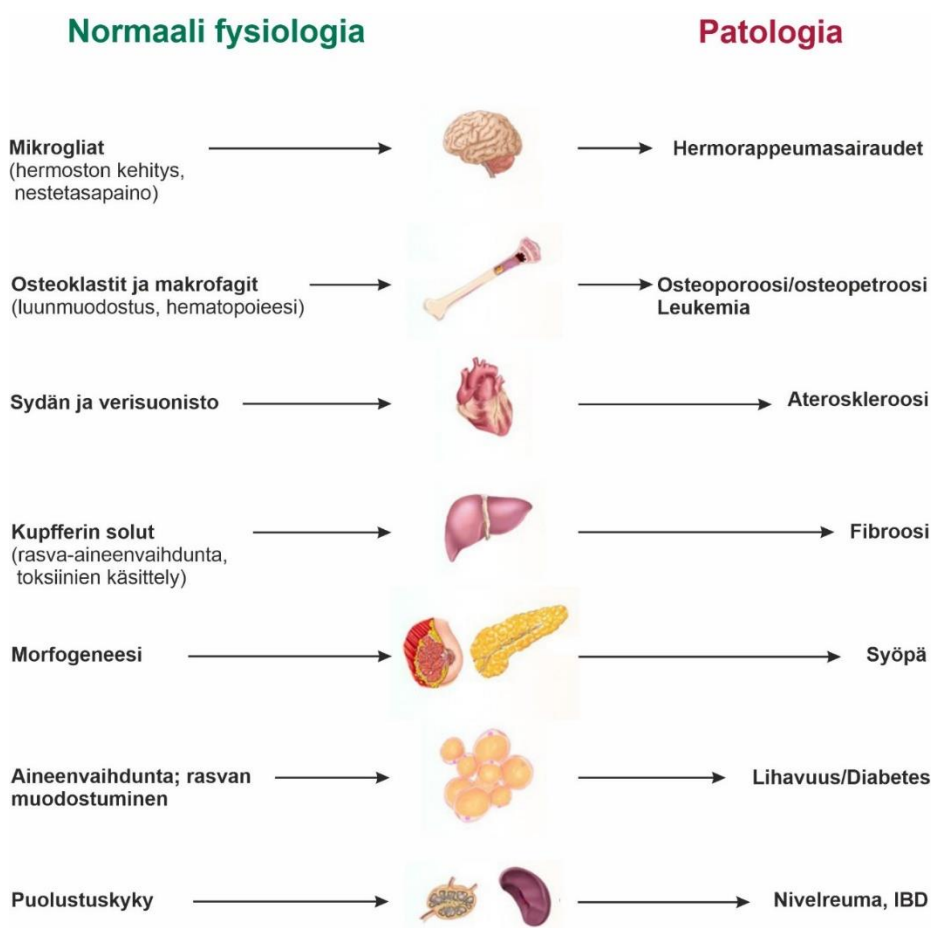
Makrofagit ovat valkosoluja, jotka ovat erikoistuneet tuhoamaan elimistölle vieraita partikkeleita kuten bakteereja ja muita taudinaiheuttajia fagosytoosilla eli solusyönnillä. Makrofagit ovat osa elimistön synnynnäistä immuunipuolustusjärjestelmää eli toisin kuin hankitun puolustusjärjestelmän B- ja T-solut, niiden vaikutus ei kohdistu yksittäistä taudinaiheuttajaa vastaan vaan tiettyihin mikrobiryhmille tunnusomaisiin, yleisiin rakenteisiin. Makrofageilla ei ole myöskään immunologista muistia, kuten hankitun immuunijärjestelmän B- ja T-soluilla. Makrofagien päätehtävät immuunipuolustuksessa ovat patogeeneiden eli taudinaiheuttajien tuhoaminen elimistöstä sekä toimiminen soluvälitteisessä immuunipuolustuksessa antigeenia esittelevinä soluina (*engl.* antigen presenting cell, APC). Makrofagit voivat pilkkoa fagosytoiduista patogeeneistä antigeeneja, esitellä niitä MHC-proteiiniensa (*engl.* major histocompatibility complex) avulla T-lymfosyytille ja aktivoida sen. Makrofagit toimivat siis eräänlaisena keskustelusiltana synnynnäisen ja hankitun immunitetin välillä.

Makrofagit voidaan jakaa karkeasti kahteen luokkaan, kudskohtaisiin makrofageihin ja veren monosyyteistä peräisin oleviin tulehduksellisiin makrofageihin. Veren monosyytit ja niistä kehittyvät makrofagit partioivat elimistön immuunipuolustuksen eturintamassa ja reagoivat nopeasti vieraisiin soluihin ja partikkeleihin. Makrofageja ei ole veressä kovin paljoa, mutta veren monosyytit reagoivat nopeasti tulehdukseen ja ne siirtyvät tulehdusvasteen myötä vaurioituneeseen kudokseen, jossa ne kypsyvät toiminnallisiksi makrofageiksi. Kudokseen siirryttyään makrofagit fagosytoivat patogeenejä ja ne voivat myös esitellä taudinaiheuttajan pintaproteiineja hankitun puolustusjärjestelmän T-soluille. Nämä makrofagit eivät siis jää kudokseen pysyvästi.

Kudskohtaiset makrofagit (*engl.* tissue-resident/tissue-specific macrophages) ovat erilaistuneita makrofageja, jotka kehittyvät osittain jo sikiökaudella. Niillä on solusyönnin lisäksi muita kudoksen kehitykseen ja normaaliin toimintaan sekä homeostasian ylläpitoon liittyviä tehtäviä. Kudskohtaiset makrofagit jäävät kudoksiin pysyvästi eivätkä palaa verenkiertoon tai siirry muihin kudoksiin. Makrofageilla on eri kudoksissa erilaisia tehtäviä, ja ne eroavat myös morfologisesti toisistaan hyvin paljon. Esimerkiksi maksan makrofagit eli Kupfferin solut poistavat verestä patogeenejä ja muita vieraspartikkeleita, ihon okasolukerroksen makrofagit eli Langerhansin solut toimivat

osana ihon immuunipuolustusta ja aivoissa olevat makrofagit eli mikroglia vaikuttavat hermoston toimintaan suojelemalla hermosoluja tulehdusreaktiolta (Rock ym. 2004). Mikroglion virheellinen toiminta voi johtaa moniin hermorappeumasairauksiin kuten Alzheimerin tautiin ja Parkinsonin tautiin (Bachiller ym. 2018) sekä amyotrofiseen lateraaliskleroosiin eli ALS:ään (Geloso ym. 2017). Sydämen makrofagit puolestaan poistavat esimerkiksi kuolevia sydänlihassoluja (Punt ym. 2020).

Samassa kudoksessa voi olla useampia erilaisia kudskohtaisia makrofagipopulaatioita, joilla on hieman toisistaan eriäviä tehtäviä. Eri populaatiot ovat saattaneet kehittyä kudokseen yksilönkehityksen eri vaiheissa. Koska kudskohtaiset makrofagit ovat tärkeitä kudoksen toiminnan kannalta, voi häiriö kudskohtaisten makrofagien kehityksessä aiheuttaa ongelmia myös koko kudoksen kehittymisessä (kuva 1). Esimerkiksi rintarauhasessa on havaittu morfologisia puutteita kudskohtaisten makrofagien depleetion vuoksi (Jäppinen ym. 2019).

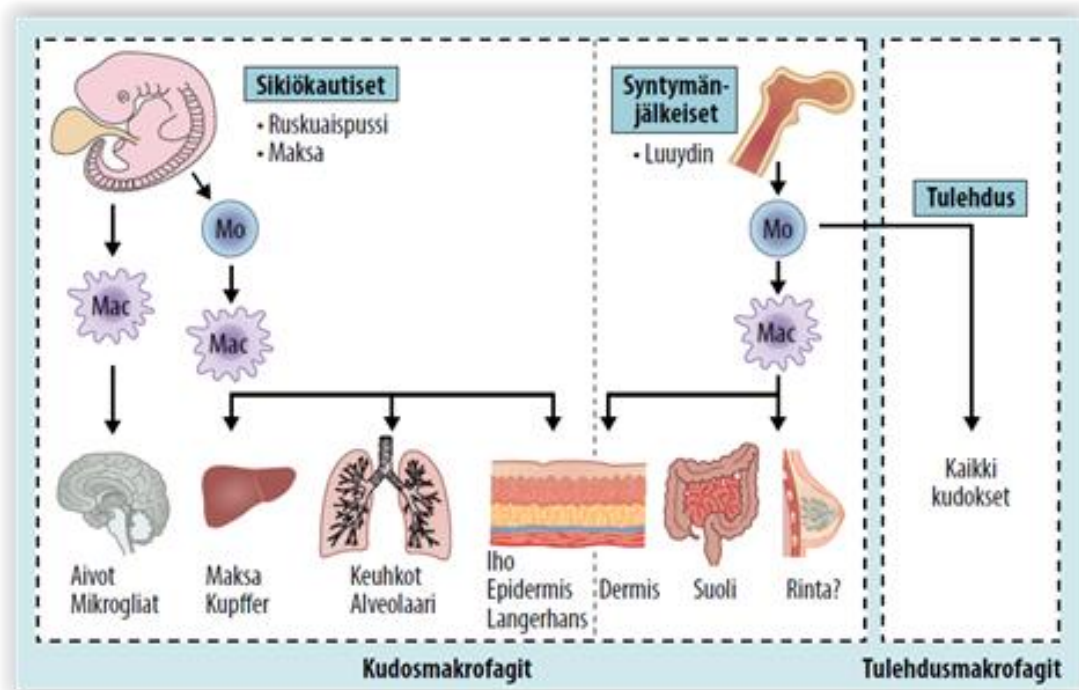


**Kuva 1. Makrofagien merkitys kudoksessa, homeostasian ylläpitämisessä sekä sairauksien synnyssä.** Makrofagit vaikuttavat useiden kudosten kehitykseen, minkä lisäksi ne ylläpitävät homeostasiaa säätelemällä aineenvaihdunnan ja hermoston toimintaa ja tunnistamalla vaurioita. Häiriöt makrofagien normaalissa toiminnassa voivat johtaa useisiin eri sairauksiin. (Wynn ym. 2013, mukaeltu).

## 1.2 Makrofagien alkuperä ja erilaistuminen

Makrofagien nimeämisestä eli vuodesta 1892 lähtien keskustelu makrofagien alkuperästä, kehityksestä ja homeostaasista on jatkunut nykypäivään (Metschnikoff 1893). Vasta-aineiden, kuvantamistekniikoiden ja geneettisten hiirimallien kehittäminen ovat kyseenalaistaneet pitkään vallalla olleen teorian siitä, että kaikki makrofagit ovat peräisin monosyyteistä. Viime aikoina onkin havaittu, että suurin osa kudskohtaisista makrofageista ei ole peräisin veren monosyyteistä, vaan ne ovat siirtyneet kudoksiin jo sikiökaudella (Gomez Perdiguero ym. 2015; Hoeffel ym. 2015). Kudsmakrofagit ovatkin yleensä joukko soluja, jotka ovat peräisin sekä sikiökaudelta että aikuisiältä.

Osa kudsmakrofageista, esimerkiksi Kupfferin ja Langerhansin solut ja mikroglia syntyvät ruskuaispussissa tai sikiön maksassa, josta ne leviävät verenkierron kautta sikiön kaikkiin kudoksiin (kuva 2). Esimerkiksi aikuisella aivojen kaikki mikroglia ovat peräisin sikiön ulkopuolisesta ruskuaispussista. Myös hiiren munasarjoilla tehdyissä tutkimuksissa on todistettu, että munasarjojen kudskohtaiset makrofagit ovat peräisin sekä sikiökaudelta että syntymän jälkeiseltä ajalta luuytimestä (Jokela ym. 2020).



**Kuva 2. Makrofagien alkuperä nykytiedon perusteella.** Sekä sikiökautiset että syntymänjälkeiset makrofagit muodostavat yhdessä kudskohtaisen makrofagipopulaation eri kudoksiin. Tulehdustilanteessa luuydinperäiset monosyytit muodostavat infektoituneeseen kudokseen nopeasti suuren makrofagipopulaation, jonka tehtävänä on tuhota elimistöä uhkaavia patogenejä. (Salmi 2017).

Ennen ajateltiin, että luuydinperäisistä monosyyteistä erilaistuvat makrofagit korvaavat kudoksissa sikiöaikana sinne asettuneet makrofagit. Nykyään tiedetään, että terveissä kudoksissa näin tapahtuu vain harvoin. Yksi poikkeus on suolisto, jossa sikiöaikana kehittynyt makrofagipopulaatio korvautuu jatkuvasti uusilla makrofageilla, jotka ovat peräisin luuytimen monosyyteistä (Bain ym. 2014). On kuitenkin huomioitava, että tulehdustilanteessa kudokskohtaisten makrofagien sijaan luuydinperäiset monosyytit tuottavat infektoituneeseen kudokseen suuren tulehdusperäisen makrofagipopulaation ja vastaavat siten nopeasti ja tehokkaasti elimistöä kohdanneeseen uhkaan.

### *1.3 Verisolujen muodostuminen eli hematopoieesi*

#### 1.3.1 Sikiökautinen hematopoieesi ja makrofagien alkuperä

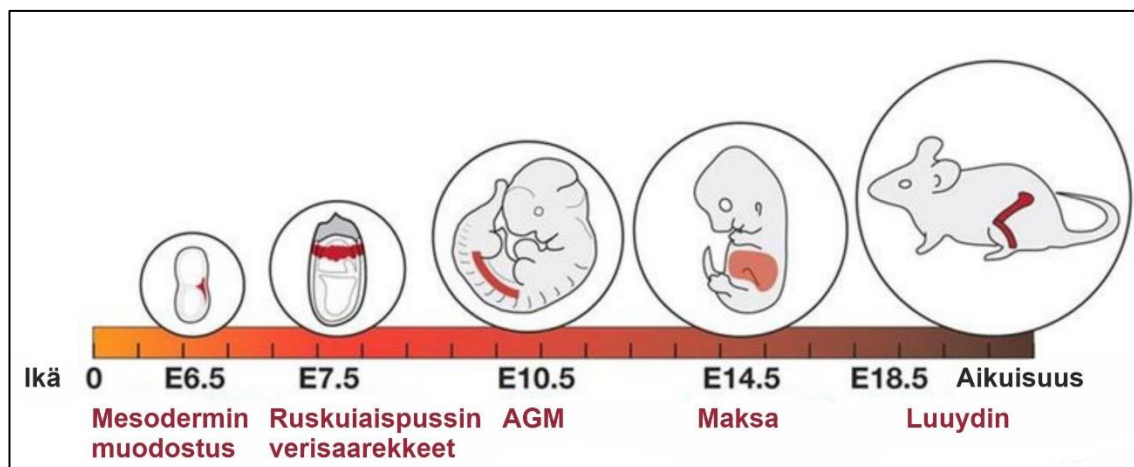
Nisäkkäillä verisolujen kehittymisen eli hematopoieesin tutkiminen on haastavaa, sillä verisolut muodostuvat monessa eri paikassa elimistöä, eri aikoina ja eri yksilönkehitysvaiheissa. Lisäksi verisolujen alkuperän selvittäminen on hankalaa, sillä suuri osa verisoluista kulkee verenkiertoelimistön mukana elimistön muihin osiin. Hiiren ja ihmisen hematopoieesi muistuttavat pitkälti toisiaan, mikä helpottaa tutkimusta. Tässä työssä esitetyt tutkimukset on tehty pääasiassa hiirimalleilla. Ihmisilläkin tehtyjä tutkimuksia on, joskin hyvin niukasti verrattuna hiiritutkimuksiin. Tutkimuksissa on usein keskitytty vertailemaan ihmisen ja hiiren hematopoieesin yhteneväisyyttä esimerkiksi solujen morfologian ja vasta-aineiden affiniteetin osalta (Stremmel ym. 2018).

1970-luvulla ajateltiin, että aikuisen nisäkkään hematopoieesia ylläpitävät solut ovat peräisin sikiön ruskuaispussin soluista ja että ruskuaispussista solut kulkeutuvat sikiön maksaan ja sieltä edelleen luuytimeen, jossa ne säilyvät aikuisiän (Dzierzak ym. 2008). Linnun alkiolla tehdyt tutkimukset viittasivat kuitenkin siihen, että aikuisen yksilön verisolut eivät ole yksinomaan ruskuaispussista peräisin, vaan ne ovat itse alkiosta ja sen allantois-rakenteesta (Dieterlen-Lievre 1975). Nykyään tiedetään, että selkärankaisilla hematopoieettinen järjestelmä kehittyy kahdessa vaiheessa; ensin ruskuaispussissa tai vastaavassa rakenteessa, ja myöhemmin dorsaalissa aortassa (Golub ym. 2013).

Aluksi ruskuaispussi tuottaa suuria tumallisia primitiivisiä erytrosyyttejä eli punasoluja, jotka hoitavat hapenkuljetuksen varhaisessa alkionkehitysvaiheessa, noin E7,5 (*engl.* embryonic age 7.5) ikäisellä hiiren sikiöllä (Golub ym. 2013) (kuva 3). Nämä erytrosyytit muodostavat niin kutsuttuja verisaarekkeitä (*engl.* blood islands), jotka sulautuvat yhteen



muodostaen ruskuaispussin alkeellisen verisuonistorakenteen. Verisaarekkeiden sisemmät solut erilaistuvat hematopoeettiseksi solukoksi. Hemangioblastit ovat kantasoluja, joista voi kehittyä joko hematopoeettisia kantasoluja tai endoteelisoluja. Ne vaeltavat ruskuaispussiin ja erikoistuvat siellä joko hematopoeettiseen tai endoteeliseen linjaan ennen verisaarekkeiden syntyä. Hemangioblasteista syntyvät primitiiviset punasolut ja ruskuaispussin alkeellista verisuonirakennetta (Dzierzak ym. 2008).



**Kuva 3. Hiiren sikiökautinen hematopoeesi.** Noin seitsemän päivän ikäisellä hiiren alkiolla verisolujen muodostus tapahtuu ruskuaispussin verisaarekkeissa. Muutaman päivän kuluttua hematopoeesi siirtyy AGM-rakenteeseen. Parin viikon ikäisellä sikiöllä maksan hematopoeettiset kantasolut tuottavat merkittävän määrän verisoluja. Syntymän aikoihin hematopoeesi tapahtuu jo lähes kokonaan luuytimessä ja jatkuu siellä koko aikuisiän. (Baron ym. 2012, mukaeltu).

Hiiren alkion ruskuaispussissa on havaittu makrofagien esiastesoluja eli makrofagiprogenitoreja pian erythro-myeloidiprekursorisolujen ilmaantumisen jälkeen (Palis ym. 1991; Yamaguchi ym. 1999). Makrofagiprogenitorit myötävaikuttavat epidermaalisten makrofagien eli Langerhansin solujen sekä maksan Kupfferin solujen syntyyn (Golub ym. 2013).

Seuraavassa vaiheessa dorsaalissa aortassa syntyy monikykyisiä hematopoeettisia progenitoreja, joita muodostuu vain kerran yksilön elinkaaren aikana. Nämä solut eivät ole vielä kypsiä hematopoeettisia kantasoluja, vaan ne kehittyvät kantasoluiksi aortassa tai sikiön maksassa hiiren alkioikäinä E11,5-E13,5 (Golub ym. 2013; DeFalco ym. 2014).

Hematopoeettiset kantasolut (*engl.* hematopoietic stem cells, HSC) kehittyvät kerran yksilön elämän aikana sikiönkehityksen aikana. James Till ja Ernest McCulloch havaitsivat 1960-luvulla ihmisen luuytimen sisältävän erikoisia monikykyisiä soluja, jotka kykenivät uusiutumaan itse (McCulloch ym. 1960). Hematopoeettiset kantasolut

olivatkin ensimmäiset ihmisestä löydetty kantasolut. Multipotentiaaliset hematopoieettiset kantasolut sekä uusiutuvat että tuottavat progenitorisoluja. On osittain epäselvää, kuinka kantasolu kykenee tuottamaan kaksi tytärsolua, joista toinen on emosolun kaltainen kantasolu ja toinen erilaistuu jonkin tietyn solulinjan soluksi. Yksi vaihtoehto on, että itse solunjakautuminen tapahtuu asymmetrisesti, eli tytärsolujen soluorganelli- ja proteiinikompositiot ovat erilaiset. Toinen vaihtoehto on, että syntyneet tytärsolut ovat lähtökohtaisesti samanlaiset, mutta ympäristön viestit muokkaavat toisen solun erilaistuvan progenitorisoluksi ja toinen taas jää ennalleen multipotentiaaliseksi kantasoluksi. Hematopoieesin tapauksessa on arveltu, että molemmat vaihtoehdot ovat käytössä samanaikaisesti. On huomattu, että tietyt proteiinit jakautuvat epätasaisesti syntyvien tytärsolujen välille. Toisaalta taas on havaittu luuytimen stroomasolujen tuottavan tekijöitä, jotka säätelevät kantasolun uusiutuvuutta. (Wolpert ym. s. 328.)

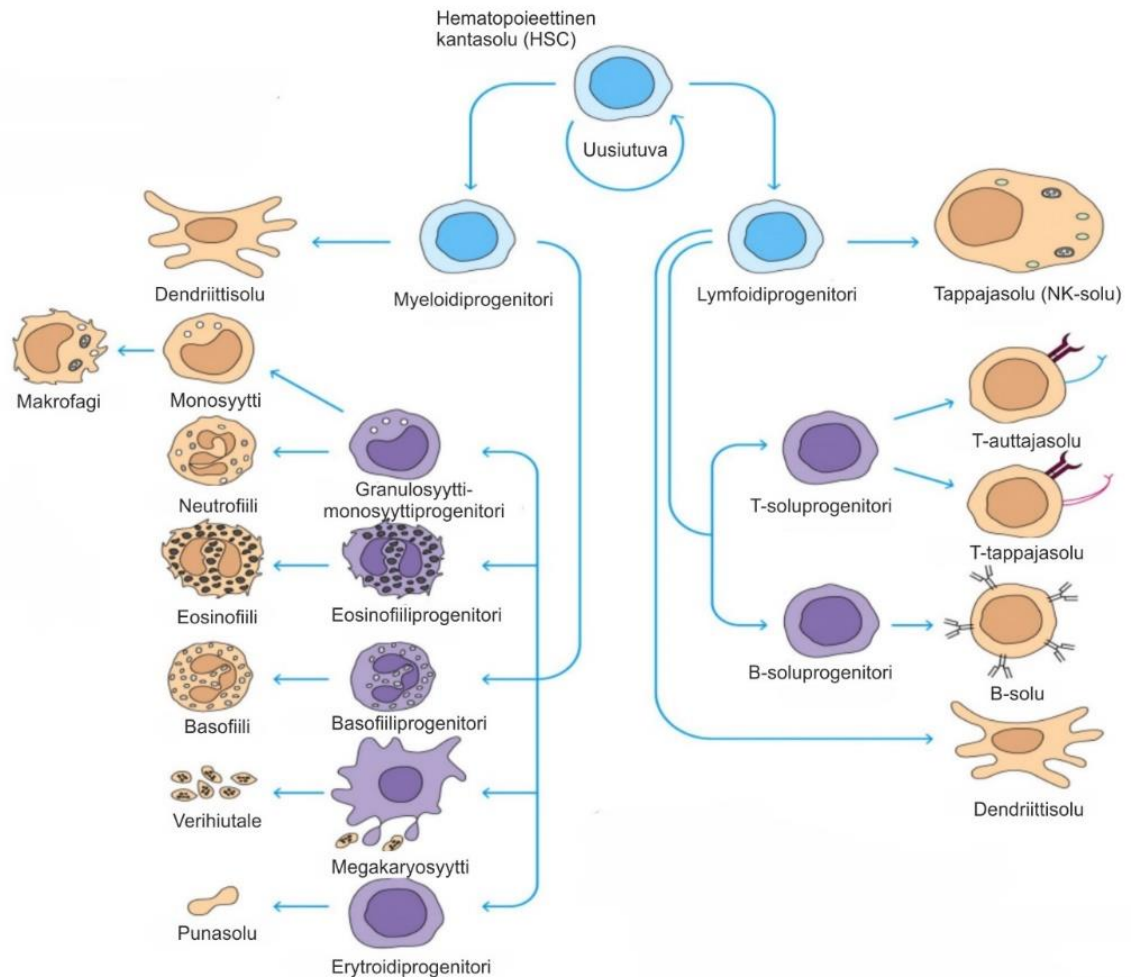
Progenitorisolut ovat kantasolujen jälkeläisiä. Jakautuessaan kantasolu tuottaa yleensä kaksi solua, joista toinen on progenitorisolu eli kantasolun jälkeläissolu ja toinen alkuperäistä kantasolua vastaava ”uusi” kantasolu. Progenitorisolut eroavat kantasoluista siinä, että ne eivät kykene tuottamaan uusia kantasoluja. Sen sijaan ne erilaistuvat jakautuessaan yhdentyypisiksi soluiksi. Progenitorisolut eivät voi myöskään jakautua loputtomiin, toisin kuin kantasolut. Progenitorisoluja on kaikissa elimistön uusiutuvissa kudoksissa.

Hematopoieettisten kantasolujen erilaistuminen verisoluiksi tapahtuu sikiön maksassa, jossa hematopoieettisten kantasolujen lukumäärä jopa 40-kertaistuu lyhyessä ajassa (Golub ym. 2013). Maksan osuus sikiöaikaisesta hematopoieesista on merkittävä. Hematopoieettiset kantasolut ja niiden progenitorisolut kulkeutuvat sikiön maksasta pernaan, jossa alkaa niiden erilaistuminen myeloidi- ja lymfoidilinjan soluiksi. Myeloidilinjan soluista kehittyy myöhemmin esimerkiksi granulositytit, makrofagit ja punasolut, kun taas lymfoidilinjan solut kehittyvät lymfosyyteiksi eli imusoluiksi. Syntymän jälkeen hematopoieettiset kantasolut siirtyvät punaiseen luuytimeen, jossa hematopoieesi jatkuu koko yksilön aikuisiän ajan.

### 1.3.2 Aikuisen hematopoieesi

Aikuisella nisäkkäällä, kuten hiirellä, kaikkien uusien verisolujen tuottaminen eli hematopoieesi tapahtuu luuytimessä. Luuytimessä on hematopoieettisia kantasoluja, joiden progenitorisolut tuottavat tarpeen mukaan eri solutyypeiksi erilaistuvia verisoluja (kuva 4). Ihmisellä kiertää veressä noin 25 biljoonaa ( $25 \times 10^{12}$ ) verisolua ja niiden elinikä

vaihtelee muutamasta tunnista kuukausiin, joten uusien verisolujen jatkuva tuotanto on elintärkeää yksilön normaalin elämän ja kehityksen kannalta. Hematopoieesissa multipotentiaaliset kantasolut kykenevät tuottamaan laajan skaalan erilaisia verisoluja, mutta eivät kuitenkaan muunlaisia soluja. Verisolut voidaan jakaa myeloidi- ja lymfoidilinjan soluihin.



**Kuva 4. Verensolujen muodostuminen eli hematopoieesi.** Verenmuodostus eli hematopoieesi tapahtuu luuytimessä, jossa hematopoieettiset kantasolut (HSC) tuottavat lymfoidi- ja myeloidiprogenitoreita, joista syntyy kaikki veren solut. (Punt ym. 2020, mukaeltu).

Lymfoidiprogenitorit tuottavat lymfoidiprekursorisoluja, joista syntyy B-lymfosyytteja, T-lymfosyytteja ja luonnollisia tappajasoluja eli NK-soluja (*engl.* natural killer cells). Lymfoidilinjan solut toimivat hankitun immunitetin puolustusreaktioissa. NK-solut tunnistavat ja tappavat elimistölle vieraat solut, kuten virustartunnan saaneet tai syöpäsolut. B-lymfosyytit eli B-imusolut syntyvät ja myös kypsyvät luuytimessä. Osa B-imusoluista erikoistuu vasta-aineita tuottaviksi plasmakaryosyyteiksi ja osa taas kehittyy

muistisoluiksi. T-lymfosyytit eli T-imusolut kehittyvät kateenkorvassa ja ne voivat erikoistua joko T-auttajasoluiksi tai T-tappajasoluiksi. T-auttajasolut eivät itse kykene tappamaan infektoituneita soluja, mutta ne kykenevät tuottamaan sytokiineja, joiden avulla elimistön immunitettijärjestelmää säädellään, minkä ansiosta muut immuunipuolustuksen solut onnistuvat tuhoamaan haitalliset solut. T-tappajasolut puolestaan tappavat haitallisen syöpäsolun tai virustartunnan saaneen solun, ja niiden toimintatapaa kutsutaan soluvälitteiseksi spesifiseksi immuunivasteeksi.

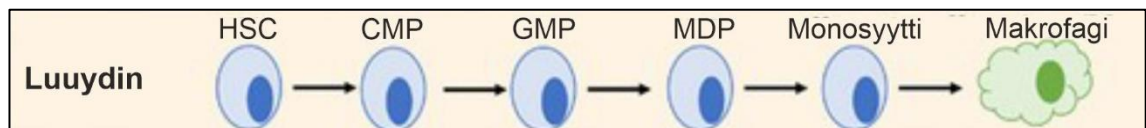
Myeloidiprogenitorisolut tuottavat esimerkiksi erytrosyyttejä, granulosityttejä, monosyyttejä ja makrofageja. Myeloidilinjan valkosolut ovat osa synnynnäistä immunitettia, joka vastaa nopeasti mihin tahansa elimistön immunitettia uhkaavaan patogeeniin. Erytroidilinjan solut tuottavat nimensä mukaisesti erytrosyyttejä eli punasoluja, mutta myös megakaryosyyttejä. Punasolujen tehtävä elimistössä on kuljettaa happea ja hiilidioksidia kudosten ja keuhkojen välillä. Suurikokoiset megakaryosyytit puolestaan tuottavat verihiutaleita, jotka ovat tärkeä osa verenhiutelmajärjestelmää. Granulositytteihin eli jyväsoluihin kuuluvat neutrofiilit, eosinofiilit ja basofiilit, jotka kehittyvät omista progenitorisoluistaan. Granulosityttien pääasiallinen tehtävä on fagosytoida mikrobeja. Neutrofiilit muodostavat suurimman osan, jopa 50–70 % verenkierroksen leukosyyteistä eli valkosoluista. Ne erilaistuvat luuytimessä ja kypsyttyään kiertävät verenkierroksen mukana vain muutamia tunteja. Verenkierron neutrofiilit siirtyvät kudoksiin ja elävät siellä muutaman päivän. Neutrofiilien tavoin myös eosinofiilit kulkeutuvat verenkierroksen mukana, kunnes siirtyvät sisälle johonkin tiettyyn kudokseen. Erityisesti ohutsuolessa on paljon eosinofiilejä, ja siellä niiden tehtäviin kuuluu muun muassa loismatojen hävittäminen. Basofiilit eivät fagosytoi patogeenejä. Sen sijaan ne sisältävät paljon jyväsiä, joiden sisällön ne vapauttavat kohdatessaan vasta-aine-antigeenikomplekseja verenkierrossa. Basofiilien jyväset sisältävät esimerkiksi histamiinia, joka verenkierroon vapautuessaan lisää sileän lihaskudoksen supistuvuutta ja verisuonten seinän läpäisevyyttä. Nämä vaikutukset tehostavat muiden immuunipuolustuksen solujen toimintaa. Myös syöttösolut eli mastosyytit (*engl.* mast cells, ei kuvassa) kuuluvat granulositytteihin. Ne sijaitsevat sidekudoksissa ja osallistuvat allergisiin reaktioihin ja siten immuunipuolustukseen. Mastosyytit sisältävät jyväsakkuloita, joissa on histamiinia, hepariinia ja muita välittäjäaineita.

Myeloidilinjan antigeenejä esitteleviin soluihin lukeutuvat monosyytit, dendriittisolut ja makrofagit. Dendriittisolut ovat erityisen tärkeitä immuunipuolustuksen aktivoimisessa, sillä ne esittelevät tehokkaasti antigeenejä T-soluille. Dendriittisolut toimivat antigeenien

esittelyn lisäksi syöjäsoluina. Monosyytit syntyvät luuytimessä ja vapautuvat sieltä verenkiertoon. Ne kiertävät verisuonistossa, kunnes siirtyvät esimerkiksi infektion seurauksena kudokseen. Siellä ne voivat erilaistua monenlaisiksi fagosytoiviksi soluiksi, kuten makrofageiksi.

### 1.3.3 Luuydinperäisten makrofagien erilaistuminen ja sen säätely

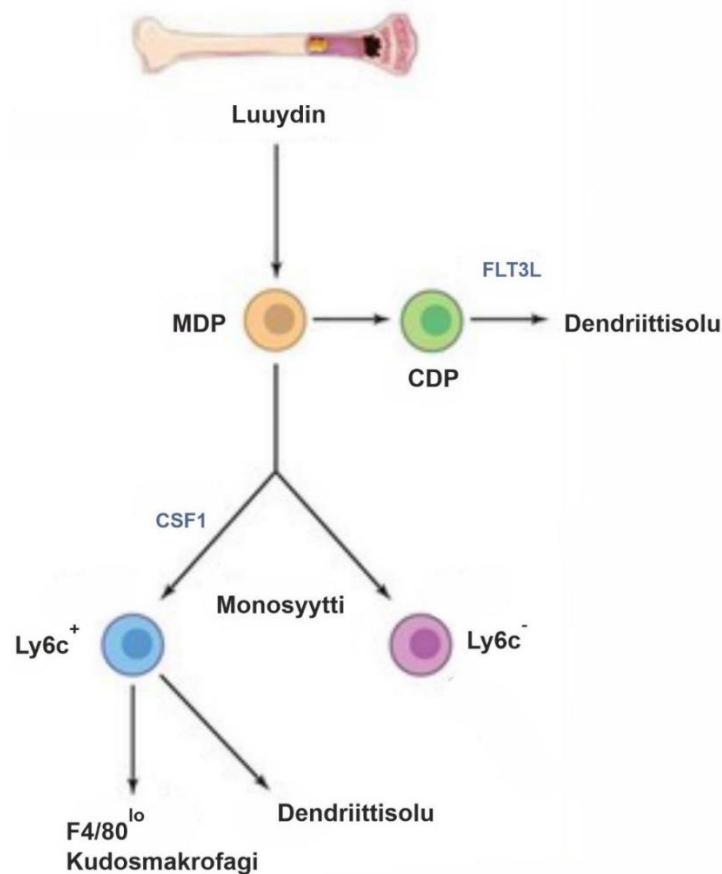
Syntymän jälkeen hematopoiesi tapahtuu luuytimessä. Hematopoieettisia kantasoluja on luuytimessä verrattain hyvin vähän; noin 1/50 000 luuytimen soluista. Luuytimen hematopoieettiset kantasolut jakautuvat ja tuottavat yleisiä myeloidiprogenitoreita (CMP, *engl.* common myeloid progenitor), jotka puolestaan erilaistuvat granulositytti-makrofagiprekursorisoluiksi (GMP, *engl.* granulocyte-macrophage precursor) (kuva 5). Nämä GMP-solut erilaistuvat MDP-soluiksi eli monosyytti/makrofagi-dendriittiprekursorisoluiksi, joista kehittyvät monosyytit. Monosyytit siirtyvät luuytimestä verenkiertoon ja edelleen verestä kudoksiin, missä ne kehittyvät makrofageiksi. Postnataalimakrofagit ovat suurimmaksi osaksi kiertäviä makrofageja eivätkä siis kehity kudoksohkeiksi makrofageiksi. Tosin hiirikokeissa on havaittu, että jos sikiökautiset makrofagit poistetaan syntymän jälkeen, luuydin pystyy korvaamaan puuttuvat kudoksohkeiset makrofagit (Scott ym. 2016).



**Kuva 5. Makrofagien erilaistuminen luuydinperäisistä monosyyteistä.** Luuytimen hematopoieettiset kantasolut (HSC) tuottavat yleisiä myeloidiprogenitorisoluja (CMP), joista erilaistuu granulositytti-makrofagiprekursorisoluja (GMP). Näistä prekursorisoluista kehittyvät monosyytti/makrofagi-dendriittiprekursorisolut (MDP), jotka edelleen erilaistuvat monosyyteiksi. Monosyytit vapautuvat luuytimestä vereen, josta ne voivat siirtyä kudokseen ja erilaistua makrofageiksi. (Zhao ym. 2018, mukaeltu).

Erilaistumisen vaiheita kontrolloidaan solun ulkopuolisilla viesteillä, kuten kasvutekijöillä. Esimerkiksi luuytimessä viestimolekyylejä tuottavat stroomasolut (*engl.* stromal cells). Kantasolujen jakautuminen ja erilaistuminen on tiukasti säädelty ja tiettyjä verisolutyyppejä tuotetaan kehon kudosten tarpeen mukaan. Verenhukan jälkeen tuotetaan runsaasti punasoluja, kun taas tulehdusreaktiossa tarvitaan paljon lymfosyyttejä ja muita valkosoluja. CSF1-makrofagikasvutekijän (*engl.* colony-stimulating factor-1)

reseptorin (CSF1R) on todettu olevan välttämätön solujen erilaistumiseksi makrofageiksi (Geissmann ym. 2010; Jones ym. 2013). CSF1 sitoutuu solun pinnalla olevaan CSF1-reseptoriin (CSF1R), mikä saa solun erilaistumaan makrofagiksi (kuva 6). Jos yksilöltä puuttuu CSF1-reseptori, makrofagien määrä kudoksissa on vähäinen, mistä seuraa ongelmia kudosten kehityksessä ja homeostasian ylläpitämisessä. Muitakin makrofagien erilaistumiseen vaikuttavia reseptoreita on olemassa, kuten IL3 ja VEGF. FLT3L-sytokiini (*engl.* FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) säätelee sekä  $Ly6c^+$ -monosyyttien että dendriittiprogenitorisolujen (CDP, *engl.* common dendritic progenitor) erilaistumista dendriittisoluiksi (kuva 6). FLT3L sitoutuu dendriittiprekursorisolun pinnalla ekspressoituun reseptoriin ja aktivoi signaalireitin, joka johtaa dendriittisolujen erilaistumiseen ja proliferaatioon (Wu 2010).



**Kuva 6. Makrofagien erilaistuminen luuydinperäisistä monosyyteistä.** Solun ulkopuoliset kasvutekijät, kuten CSF1 ja FLT3L, ovat oleellisia solujen erilaistumisen kannalta. CSF1 johtaa solun erilaistumiseen makrofagiksi, ja FLT3L saa solun erilaistumaan dendriittisoluksi (Wynn ym. 2013, mukaeltu).

Eri erilaistumisvaiheessa olevat makrofagit voidaan tunnistaa solujen ilmentämien pinta-antigeenien perusteella, jotka on luokiteltu niin sanottuun CD-järjestelmään (*engl.* cluster of differentiation). Yhtenäinen CD-järjestelmä otettiin käyttöön 1980-luvun alussa. Ideana on, että saman antigeenin tunnistavat monoklonaaliset vasta-aineet, riippumatta niiden kauppanimestä, jaotellaan CD-luokkiin antigeenien tunnistamien pintaproteiinien perusteella. Kudosspesifiset signaalit säätelevät ja ohjaavat makrofagien erilaistumista kyseisen kudoksen tarpeita palvelemaan suuntaan. Eri makrofagifenotyypit voidaan määrittää CD-antigeneilla, ja saada luotettavaa tietoa solujen alkuperästä ja erilaistumisreitistä. CD-luokittelua käytetään nykyään laajasti tutkimuksessa sekä kliinisessä lääketieteessä muidenkin kuin immuunipuolustuksen solujen luokitteluun.

Peinteisesti makrofagitutkimus on keskittynyt selvittämään makrofagien toimintaa immuunipuolustuksen syöjäsoluina ja antigeneja esittelevinä soluina, ja niiden toiminta yksilönkehityksessä ja kudoshomeostasian säätelyssä on jäänyt taka-alalle. Nykyään ymmärretään kuitenkin entistä paremmin makrofagien toiminta kudosten kehityksessä ja toiminnan ylläpidossa. Makrofagien puuttumisen kriittisissä kehitysvaiheissa on havaittu johtavan vaikeisiin morfologisiin ja toiminnallisiin häiriöihin monissa eri kudoksissa (kts. kuva 2). Kaikkia makrofagien toimintoja ei tunneta vielääkään läpikotaisin. Viime aikoina mielenkiinto kudiskohtaisten makrofagien alkuperän selvittämiseksi on lisääntynyt ja uusia näkökulmia kudiskohtaisten makrofagien alkuperästä paljastuu jatkuvasti.

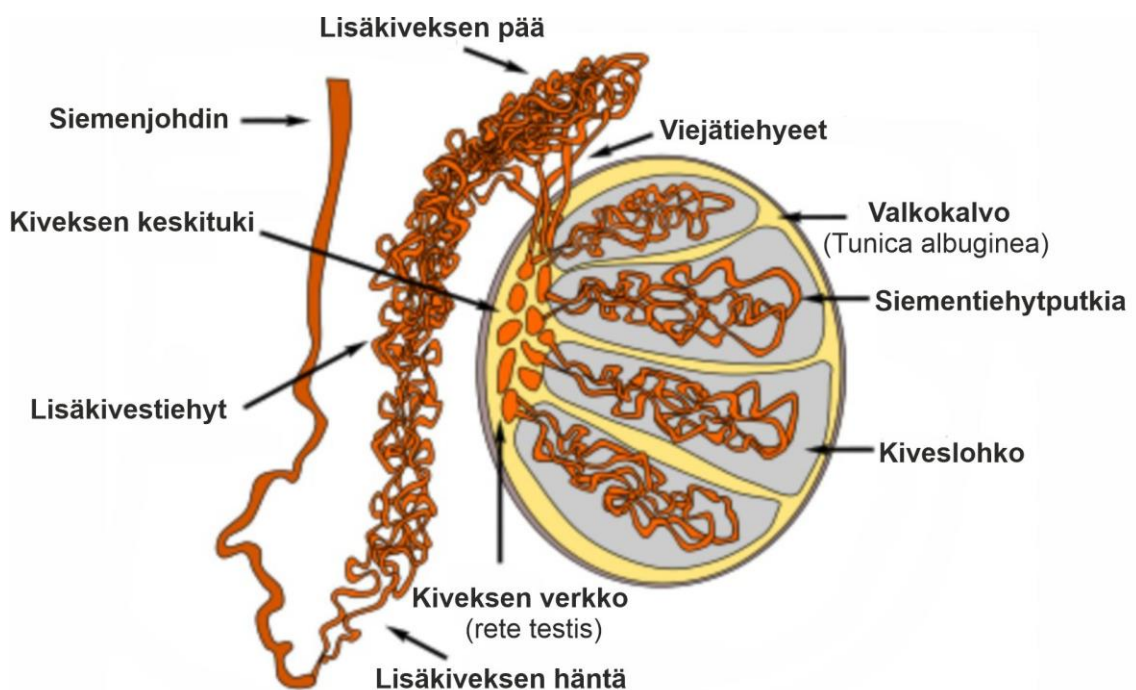
## 1.4 Kives

### 1.4.1 Kiveksen rakenne

Kives on urospuolisen selkärankaisen eläimen parillinen sukupuolirauhanen, joka tuottaa sukupuolihormoneja ja miessukusoluja eli siittiöitä. Kivekset ovat osa kehon endokriinijärjestelmää ja niissä tuotetaan mieshormoneja eli androgeenejä, joista tärkein on testosteroni. Suurimmalla osalla nisäkkäistä kivekset sijaitsevat kivespussissa, scrotumissa, minkä vuoksi kiveksen lämpötila on muuta kehoa alhaisempi. Tämä on merkittävä tekijä siemennesteen tuotannolle, sillä se vaatii yleensä pari astetta kehon lämpötilaa alhaisemman lämpötilan. Ihmisellä kivespussi on pysyvästi kehon ulkopuolella, mutta joillakin nisäkkäillä kivespussi on kehon ulkopuolella ainoastaan lisääntymiskauden aikana. Näillä eläimillä, kuten tietyillä hiirilajeilla, kivespussi ja kivekset ovat lisääntymisaikaa lukuun ottamatta vetäytyneenä kehon vatsaonteloon. Joillain nisäkkäillä, kuten delfineillä, valailla ja hylkeillä, kivekset sijaitsevat aina kehon

sisäpuolella, mutta näilläkin nisäkkäillä kivesten lämpötilan on havaittu olevan muuta ruumiinlämpötilaa pari astetta alhaisempi (Hill ym. 2012).

Kiveksissä on kierteisiä siementiehyitä eli tubuluksia, joissa sperman tuotanto tapahtuu. Tiehyet ovat ohuita, halkaisijaltaan noin 0,2  $\mu\text{m}$ , mutta hyvin pitkiä, ihmisellä jopa 30–70 cm. Siementiehyitä ympäröi niin kutsuttu interstitiaali- eli välitila, jossa sijaitsee verisuonia, fibroblasteja ja leukosyyttejä. Tärkeimpiä välitilan soluja ovat suuritumaiset Leydigin solut, jotka tuottavat testosteronia vasteena aivolisäkkeen erittämälle luteinisoivalle hormonille (LH). Testosteronia erittyy miehillä kivesten lisäksi lisämunuaisista.



**Kuva 7. Kiveksen rakenne.** Kives jakautuu useisiin lohkoihin, jotka ovat täynnä siementiehytputkia, joissa siittiöt kehittyvät. Kehittyneet siittiöt siirtyvät siementiehytputkista viejätiehyitä pitkin lisäkivekseen ja sieltä edelleen siemenjohtimeen. (Atlas of Plant and Animal Histology 2020, mukaeltu).

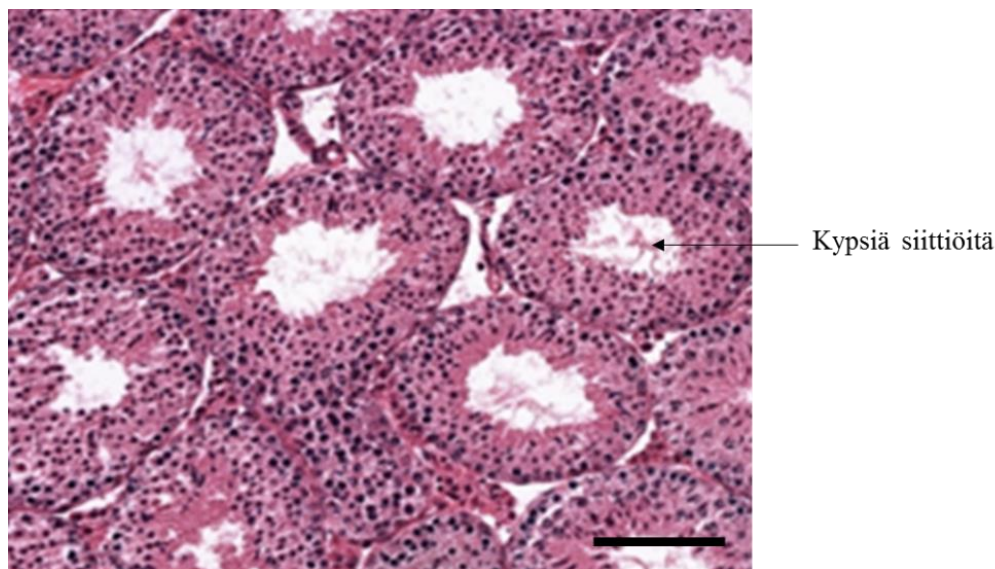
Kiveksen siementiehyiden epiteelissä on somaattisia tukisoluja eli Sertolin soluja, jotka varmistavat kehittyvien siittiöiden ravinnonsaannin ja siten edistävät ja auttavat siittiötuotantoa. Lisäksi Sertolin solut fagosytoivat siittiöntuotannon aikana apoptoottisesti tuhoutuvia spermatoosyyttejä. Sertolin solut muodostavat peritubulaarisen solukerroksen kanssa tiiviin liitoksen (*engl.* tight junctions), joista muodostuu yhtenäinen siemenepiteelin soluliitos eli niin sanottu veri-kiveseste. Se säätelee ravinteiden ja



hormonien pääsyä siementiehyisiin. Erilaiset veri-kudosesteet elimistössä, kuten veri-aivoeste ja veri-istukkaeste, säätelevät aineiden kulkua jonkin elimen ja muun kehon välillä. (Kaur ym. 2014.)

Sertolin solut kehittyvät niin kutsutuista pre-Sertolin soluista, jotka ohjaavat sukurauhasen kehittymistä kivekseksi aikaisessa kehitysvaiheessa. Ihmisillä ja muilla kädellisillä pre-Sertolin soluja säätelee sukupuolta määrittävä SRY-geeni. SRY:n säätelemänä pre-Sertolin solut ilmentävät sukupuolta määrittävää Sox9-geeniä, jonka toiminnan seurauksena sukupuolirauhasen kehittyminen munasarjoiksi estyy. Sertolin solut aktivoituvat aivolisäkkeen etulohkon erittämän FSH:n eli follikkeleita stimuloivan hormonin vaikutuksesta. Sertolin solut erilaistuvat lopullisesti spermatogeneesin käynnistyttyä, eivätkä ne jakaudu enää aikuisiässä.

Sertolin solujen lisäksi rakenteellista tukea kehittyville siittiöille antavat siementiehyitä ympäröivät peritubulaariset myoidisolut (*engl.* peritubular myoid cells, PMCs). Myoidisolut kommunikoivat siementiehyiden sisällä olevien Sertolin solujen kanssa (DeFalco ym., 2015). Myoidisolujen muodostama sileä lihaskudos mahdollistaa siementiehyiden peristalttisen liikkeen ja siten solut edistävät kypsien siittiöiden kulkua siementiehyissä (kuva 8).



**Kuva 8. Kiveksen histologia. HE-värjätty hiiren kives (5 vk).** Siementiehyet näkyvät pyöreinä rakenteina kiveksen poikkileikkauksessa. Tubulusten keskellä on kypsyneitä siittiöitä, jotka lähtevät siementiehyitä pitkin lisäkivekseen. Mittajana 50 µm. (Kuva: Laura Lintukorpi).

#### 1.4.2 Kiveksen kantasolut ja spermatogeneesi

Siittiöt kehittyvät kiveksen kantasoluista, spermatogonioista (*engl.* spermatogonial stem cell, SSC), jotka ovat erilaistumattomia miehen sukusoluja. Spermatogoniat kykenevät uusiutumaan ja erilaistumaan siittiöiksi kehittyviksi spermatosyyteiksi. Spermatogonioiden uusiutumista ja erilaistumista säädelään tarkasti, ja häiriöt kantasolujen toiminnassa voivat johtaa alhaiseen spermantuotantoon ja hedelmättömyyteen. Spermatogoniat kypsyvät vaihe vaiheelta valmiiksi siittiöiksi spermatogeneesissä. Spermatogeneesi jaetaan kolmeen vaiheeseen. Ensimmäisessä vaiheessa spermatogoniat lisääntyvät eli proliferoituvat mitoottisesti, toisessa vaiheessa spermatosyytit jakautuvat meioottisesti, eli tapahtuu DNA:n rekombinaatio sekä vähennys- ja tasausjako ja lopuksi tapahtuu spermiogeneesi eli spermatidien erilaistuminen valmiiksi siittiöiksi.

Spermatogoniat sijaitsevat lähellä siementiehyiden ulkoreunaa, ja kehittyvä siittiö siirtyy hiljalleen kohti siementiehyen keskustaa, luumenia. Primäärinen spermatosyytti käy läpi kaksi meioottista jakautumista, jolloin sen kromosomiluku puolittuu. Tällaista solua kutsutaan spermatidiksi, ja kun se lopulta kypsyä valmiiksi siittiöksi, se kulkeutuu siementiehyttä pitkin ja vapautuu siementiehyen luumeniin. Jokaisesta primaarisesta spermatosyytistä syntyy siis lopulta neljä siittiötä, joista jokaisessa on haploidi kromosomimäärä. Siittiöiden vaiheittainen tuotanto on jatkuvaa ja niitä tuotetaan koko yksilön eliniän ajan FSH:n säätelemänä. Siittiöiden tuotanto vaihtelee iän myötä, ja miehen hedelmällisyyden on todettu olevan korkeimmillaan 30-35 ikävuoden vaiheilla, ja laskevan selkeästi noin 55 ikävuoden jälkeen (Levitas ym. 2007). Useat muutkin tekijät, kuten huonot elämäntavat heikentävät siittiöiden tuotantoa ja laskevat hedelmällisyyttä (Durairajanayagam 2018).

#### 1.4.3 Kiveksen immuunijärjestelmä

Syitä siittiöiden immunogeenisyydelle ei tarkkaan tiedetä, mutta on arvioitu, että yksi osatekijä voisi olla niiden tuotantoajankohta. Syntymän aikaan kiveksen sukusolut koostuvat vain spermatogonioista, sillä spermatosyytit ja spermatidit ilmestyvät vasta murrosiän tai sukukypsyyden saavuttamisen aikaan, kun siittiöiden tuotanto käynnistyy. Tämä tapahtuu siis kauan sen jälkeen, kun immuunijärjestelmän autoreaktiiviset eli yksilön omia soluja ja kudoksia vastaan reagoivat T-solut on karsittu pois ja kehon muu puolustusjärjestelmä on jo hyvin pitkälle kehittynyt. Tästä syystä siittiöt ovat

elimistölle uusia rakenteita ja niiden vieraat pintaproteiinit aiheuttavat immuunivasteen. (Kaur ym. 2014.)

Koska siittiöitä kohtaan ei ole muodostunut sietokykyä eli immunologista toleranssia sikiöaikana ja varhaislapsuudessa, ne voivat laukaista epätarkoituksenmukaisesti ja liian voimakkaasti autoimmuunireaktion. Lähtökohtaisesti kiveksessä näin ei kuitenkaan käy, sillä siellä ei tapahdu normaalia immuunivasteen aktivaatiota ja tulehdusreaktion muodostumista vieraita antigeeniä vastaan (*engl.* immuno privilege). Suurimmaksi osaksi tämä johtuu Sertolin solujen immunosuppressiivisesta eli puolustuskykyä lamaavasta vaikutuksesta sekä solujen muodostamasta veri-kivesesteestä, joka toimii puskurina siittiöiden ja muun kehonosien välillä. Myös Leydigin solujen androgeenin tuotanto sekä tulehdusta hillitsevät M2-kaltaiset makrofagit vaikuttavat immuunisuppressioon (Meinhardt ym. 2011). Siittiöt eivät siis pääse muualle kehoon aiheuttamaan immuunivastetta, eikä kehon puolustusjärjestelmä pääse tuhoamaan vieraksi soluiksi tulkittuja siittiöitä.

Kiveksen immuunitasapainon häiriöt vaikuttavat siemennesteen laatuun ja siten sperman hedelmöityskykyyn (Hedger, 2002; Meinhardt ym. 2011). Esimerkiksi siittiöitä kohtaan voi syntyä vasta-aineita vamman, leikkauksen tai tulehduksen seurauksena, kun veri-kiveseste vaurioituu. Vasta-aineiden vaikutus hedelmöityskykyyn on vielä melko epäselvä. Koska siittiöiden tuotanto ja toiminta ovat elintärkeää lajin jatkamisen kannalta, on todennäköistä, että siittiöitä suojaavia mekanismeja on muitakin.

#### 1.4.4 Kiveksen makrofagit ja niiden alkuperä

Kudoskohtaisilla makrofageilla on perinteisen, immuunipuolustukseen liittyvän toiminnan lisäksi muitakin tehtäviä kudoksissa. Esimerkiksi sikiön aivojen verisuoniston kehittyminen riippuu kudoskohtaisten makrofagien toiminnasta (Fantin ym. 2010). Samankaltainen vaikutus on havaittu hiljattain hiiren maitorauhasen kehityksessä (Jäppinen ym. 2019). Tutkimuksessa osoitettiin, että sikiökaudelta peräisin olevat kudoskohtaiset makrofagit vaikuttavat maitorauhasen normaaliin kehitykseen. Kiveksen makrofagien tiedetään osallistuvan muun muassa spermatogeneesin ja steroidien tuotannon säätelyyn, sekä homeostasian ylläpitoon kiveksessä. DeFalcon tutkimus osoitti, että makrofagien puutos kiveksessä johtaa spermatogonioiden erilaistumisten häiriöön (DeFalco ym. 2015).

Normaalisti kiveksen makrofagit sijaitsevat yksinomaan siementiehyiden välissä eli interstitiumissa, joskin ihmisellä ne voivat sijaita myös tiehyiden seinämässä, mutta

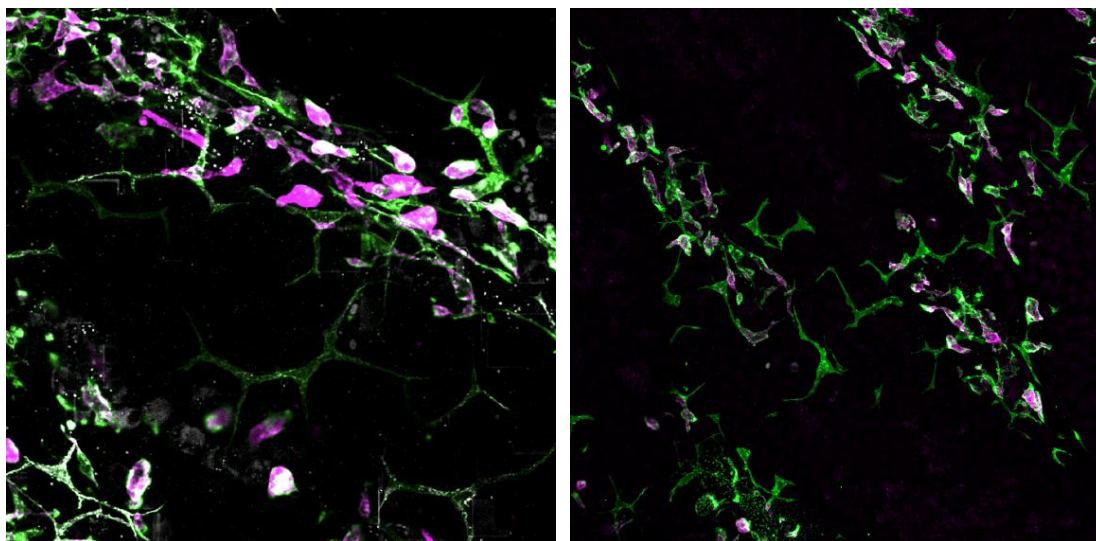
eivät koskaan varsinaisessa siemenepiteelissä. Aikuisen hiiren kiveksen interstitiumin eli välitilan soluista jopa 20 % on makrofageja (Hume ym. 1984), mikä on huomattavasti suurempi osuus kuin muissa kudoksissa. Makrofagit ovatkin suurin leukosyyttipopulaatio kiveksessä (Hume ym. 1984; Niemi ym. 1986). Hiiren kiveksessä on kaksi eri makrofagipopulaatiota, jotka eroavat toisistaan sekä rakenteellisesti että toiminnallisesti. Interstitiaaliset, CD206<sup>+</sup> -makrofagit sijaitsevat siementiehyiden välitilassa eli interstitiumissa, kun taas MHC II<sup>+</sup> -makrofagit sijaitsevat siementiehyiden pinnalla (Lokka ym. 2020). Kiveksen makrofagipopulaatiot voidaan jakaa myös M1 ja M2 tyyppin makrofageihin. M2-tyypin makrofagit, jotka ilmentävät niille tyypillistä mannoosireseptoria (CD206), ovat sikiökautisia ruskuaispussiperäisiä makrofageja. M2 makrofagit sijaitsevat kiveksen interstitiaalitallassa. Ruskuaispussista peräisin olevat makrofagit ohjaavat alkion kiveksen morfogeneesia ja vaskularisaatiota eli verisuonitusta ja M2 makrofagien puuttumisen on havaittu aiheuttavan ongelmia verisuonten kehityksessä ja varhaisten siementiehyiden muodostumisessa (DeFalco ym. 2014). Siementiehyiden oikeanlainen kehitys on oleellista spermatogeneesille ja androgeenien tuotannolle.

Kiveksen makrofagipopulaatioiden alkuperä on ollut epäselvä ja eriäviä tutkimustuloksia on paljon. Interstitiaalisen CD206<sup>+</sup> -makrofagipopulaation on melko yksimielisesti ajateltu olevan peräisin sikiökaudelta, mutta peritubulaarisen MHC II<sup>+</sup> -populaation alkuperän selvittäminen on ollut hankalampaa. Esimerkiksi Mossadegh-Keller kollegoineen (2017) on todennut, että peritubulaarinen makrofagipopulaatio syntyy täysin postnataalisti luuydinperäisistä progenitorisoluista, ja että nämä luuydinperäiset progenitorit osallistuisivat myös interstitiaalisen makrofagipopulaation tuottamiseen.

Makrofagit kommunikoivat Leydigin solujen kanssa ja siten ohjaavat steroidogeneesiä eli steroidien, kuten testosteronin tuotantoa (Cohen ym. 1997), tosin tarkka mekanismi ei ole aivan selvillä. Lisäksi on havaittu, että makrofagien puutos kiveksessä häiritsee spermatogonioiden erilaistumista (DeFalco ym. 2015), mikä viittaa siihen, että makrofageilla on tärkeä tehtävä siittiöntuotannossa. Kiveskohtaiset makrofagit sijaitsevatkin lähellä erilaistumattomia spermatogonioita.

Toisin kuin jo sikiökaudella havaittavat CD206<sup>+</sup> -makrofagit, MHC II<sup>+</sup> -makrofagit ilmestyvät hiiren kivekseen yleensä vasta kahden viikon iässä, aikaisintaan yhden viikon iässä. Nämä niin kutsutut peritubulaariset makrofagit löytyvät nimensä mukaisesti kiveksen siementiehyiden reunoilta ja ne muistuttavat morfologisesti enemmän haaraisia

dendriittisoluja. CD206<sup>+</sup> - ja MHC II<sup>+</sup> -makrofagit ovat helposti erotettavissa toisistaan morfologiinkin perusteella (kuva 9).



**Kuva 9. CD206<sup>+</sup> - ja MHC II<sup>+</sup> -makrofagit erottuvat toisistaan morfologisesti sekä sijainniltaan kudoksessa.** Konfokaalimikroskooppikuvat viiden viikon ikäisen hiiren kiveksestä. Vihreällä värillä näkyvät haarakkeiset peritubulaariset MHC II<sup>+</sup>-makrofagit ja pinkillä värillä interstitiaaliset CD206<sup>+</sup> -makrofagit. (Kuvat Emmi Lokka ja Laura Lintukorpi, 2018 ja 2019).

Yleisesti ajatellaan, että MHC II<sup>+</sup> -makrofagipopulaatio on peräisin luuytimestä, mutta uudet tutkimustulokset kyseenalaistavat tämän näkemyksen. Dosentti Rantakarin ryhmässä on selvitetty hiiren kiveksen makrofagipopulaatioiden alkuperää. Rantakarin ryhmässä tehdyillä depleetiokokeilla ja solulinjatutkimuksilla *in vivo* on kyetty osoittamaan, että MHC II<sup>+</sup> -solupopulaatio ei ole peräisin luuytimen monosyyteistä, muttei myöskään ruskuaispussista tai sikiön maksasta. Ryhmän tutkimusten mukaan populaatio on kuitenkin peräisin jostakin, toistaiseksi tuntemattomasta sikiöperäisestä lähteestä (Lokka ym. 2020).

### 1.5 Tutkimuskysymys

Vallitseva käsitys on, että hiiren kiveksessä on kaksi toiminnallisesti ja alkuperältään erilaista makrofagipopulaatiota, joista toinen on peräisin sikiökaudelta ruskuaispussin tuottamista soluista ja toinen on peräisin luuytimestä. Pia Rantakarin ryhmä (Turun Biotiedekeskus) on kuitenkin osoittanut, ettei luuydintä tarvita toisen makrofagipopulaation muodostumiseen (Lokka ym. 2020). Epäselvää kuitenkin on, mistä toinen populaatio on peräisin. Tutkimushypoteesina on se, että hiiren kiveksen toinen makrofagipopulaatio on peräisin sikiöperäisistä hematopoeettisista kantasoluista, jotka

ovat jääneet kivekseen yksilönkehityksen aikana niin sanotusta aortta-gonadi-mesonefros-juosteesta (AGM). Hypoteesia tukisi se, että hiiren kehittyvästä kiveksestä havainnoitaisiin hematopoieettisia kantasoluja. Nämä kantasolut voisivat olla kiveksen makrofagien esisoluja. Hematopoieettisten kantasolujen osoittaminen hiiren kehittyvästä kiveksestä ei kuitenkaan automaattisesti tarkoita sitä, että makrofagit ovat niistä peräisin, mutta löydös avaisi aivan uuden lähestymistavan kiveksen MHC II<sup>+</sup> -makrofagipopulaation alkuperän selvittämiseen.

Spesifiset tutkimuskysymykset ovat

I. *Onko hiiren kehittyvässä kiveksessä löydettävissä hematopoieettisia kantasoluja ja ovatko MHC II<sup>+</sup> -makrofagit peräisin näistä soluista?*

II. *Missä osissa kivistä ja missä kehitysvaiheissa hematopoieettiset kantasolut lokalisoituvat ja paljonko kantasoluja on kehittyvässä kiveksessä?*

## 2. MATERIAALIT JA METODIT

### 2.1 Hiiret

Työssä käytettiin villityypin uroshiiriä hybriditaustaisesta Plvap full KO (Plvap<sup>tm1Salm</sup>) ja yleisesti käytetystä sisäsiittoisesta C57BL/6NRj (6N, Janvier Labs) kannoista. Hiiret kasvatettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa standardiolosuhteissa. Huoneiden lämpötila oli +21 °C ±3 °C ja ilmankosteus 55 % ±15 %. Valorytmi oli normaali, 12 h valoa (klo 07.00 – 19.00) ja 12 h pimeää. Ruokaa ja vettä oli jatkuvasti eläinten saatavilla. Kaikki eläinkokeet suoritettiin Suomen koe-eläinlautakunnan hyväksymän tavoin (lisenssinumero ESAVI438/04.10.03/2012) ja EU-lainsäädännön mukaisesti noudattaen EU-direktiiviä 2010/63/EU.

Plvap full KO-hiirikantaa ylläpidetään heterotsygoottisena (Plvap<sup>+/-</sup>), sillä homotsygoottina poistogeenisenä (Plvap<sup>-/-</sup>) genotyyppi on letaali. Heterotsygoottien vanhempien jälkeläisten genotyyppi selvitetään korvapaloista eristetyn DNA:n avulla ja poikaset määritetään siis joko homotsygooteiksi *plvap*-poistogeenisiksi (*engl.* knock-out, KO, Plvap<sup>-/-</sup>), homotsygooteiksi villityypin hiiriksi (*engl.* wild type, WT, Plvap<sup>+/+</sup>) tai sitten heterotsygooteiksi yksilöiksi (*engl.* heterozygous, hez, Plvap<sup>+/-</sup>). Tässä tutkimuksessa käytettiin homotsygoottien villityyppien (Plvap<sup>+/+</sup>, WT) poikasia, jotka olivat kaikki homotsygootteja villityyppejä (WT) ja joilla on täysin normaali, toimiva *plvap*-geeni homotsygoottisena.

Kudoksia kerättiin vastasyntyneiltä hiiriltä sekä 14 ja 16 päivän ikäisiltä alkioilta (E14,5 ja E16,5). WT-naaras ja WT-koiras laitettiin samaan häkkiin, kunnes parittelu onnistui. Parittelun jälkeen naaraan emättimen aukolle syntyy niin kutsuttu parittelutulppa, joka on havaittavissa parittelua seuraavana aamuna. Kun tulppa havaittiin, uros poistettiin häkistä ja naaraan tiineyden katsottiin alkaneen tästä hetkestä (sikiöiden iän lasketaan olevan E0,5). Hiiret olivat yleensä paritushäkissä 4 päivää, ja jos naaraalla ei havaittu parittelutulppaa, paritus purettiin. Poikaset syntyvät 18-20 päivää parittelutulpan havaitsemisen jälkeen.

E14,5 ja E16,5 alkioita kerättiin lopettamalla raskaana olleet hiiriemot hiilidioksidilla ja niskavenytyksellä ja kohdut kerättiin kylmään fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS-tablets, Gibco). Kohtuja pidettiin kylmässä PBS:ssä 20-30 minuuttia, mikä aiheuttaa alkioille hypotermian ja tajuttomuuden. Tämän jälkeen alkiot preparoitiin

kohdusta, lopetettiin dekapitaatiolla ja tutkimuksessa tarvittavat kudokset preparoitiin. Vastasyntyneet uroshiiret lopetettiin dekapitaatiolla ja kudokset preparoitiin. Preparoidut kudokset käytettiin tuoreeltaan virtaussytometriaan, pesäkekokeisiin ja whole mount-menetelmään.

## 2.2 Virtaussytometria

Virtaussytometrialla (*engl.* fluorescence-activated cell sorting, FACS) saadaan eroteltua eri solupopulaatiot toisistaan ja määrittää solujen lukumäärä esimerkiksi leimaamalla ne fluoresoivilla vasta-aineilla. Virtaussytometrissa solut on oltava suspensiossa, joten tutkittava kudos hajoitetaan ensin solususpensioksi, minkä jälkeen solut värjätään vasta-aineilla. Solut kulkeutuvat virtaussytometrin virtauskammion läpi yksitellen ja eri aallonpituuksia tuottavat laserit virittävät vasta-aineisiin konjugoidut fluorokromit, joista emittoituva valo havaitaan ilmaisimella. Näin soluja voidaan jaotella niiden pintaproteiineihin kiinnittyneiden vasta-aineiden perusteella. Tässä tutkimuksessa virtaussytometrissa analyysia käytettiin tunnistamaan hiiren kiveksestä hematopoieettinen kantasolupopulaatio.

### 2.2.1 Kudosten keräys ja käsittely virtaussytometriaa varten

Virtaussytometriin mittauksiin kerättiin kivekset ja perna. Vastasyntyneiden hiirten kivekset kerättiin 24-kuoppalevyllä kylmään HBSS-liuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma), ja kudosten rakenne hajotettiin mekaanisesti saksilla. Saman yksilön molemmat kivekset yhdistettiin yhdeksi näytteeksi, mikä huomioitiin tuloksia analysoitaessa. Mekaanisen hajotuksen jälkeen kudos pilkottiin entsyymaattisesti kollagenaasi D:llä (1 mg/ml HBSS) (Roche) ja DNAasilla (50 µg/ml HBSS) (Roche). Kudoksia pidettiin 30 minuuttia +37 °C:ssa, minkä jälkeen näyte resuspensoitiin huolellisesti kudossmassan homogenisoimiseksi. Lopuksi suspensio suodatettiin silkkikankaan (tiheys 77 µm) läpi ennen vasta-ainevärjäystä, jotta päästiin eroon suuremmista kudospaleista. Kivesten lisäksi jokaista virtaussytometriamittausta varten kerättiin kolmelta hiireltä pernat, jotka yhdistettiin yhdeksi näytteeksi. Pernasta eristettyjä soluja käytettiin värjäyksissä teknisenä kontrollina. Pernoille tehtiin sama mekaaninen ja entsyymaattinen hajotus kuin vastasyntyneiden hiirten kiveksille. Eristyksen jälkeen solumääriä ei määritetty.



Hiiarten E14,5 ja E16,5 alkoiden kivekset kerättiin kylmään EPICS I:een (500 µl, liuosten valmistusohjeet ovat liitteessä 1) ja rakenne hajotettiin pipetillä suspensoimalla. Mekaaninen hajotus oli riittävä hajottamaan alkoiden kiveksen rakenteen, eikä entsymaattista hajotusta tehty lainkaan. Solususpensio suodatettiin kerran silkkikankaan (tiheys 77 µm) läpi, minkä jälkeen solut värjättiin vasta-aineilla. Riittävän solumäärän varmistamiseksi saman pentueen urosalkoiden kivekset yhdistettiin aina yhdeksi näytteeksi.

### 2.2.2 Solujen vasta-ainevärjäys ja virtaussytometria

Kudoksista eristetyt solut siirrettiin 96-kuoppalevyille ja pelletöitiin (500 x g, Eppendorf Centrifuge 5810 R) Ennen vasta-ainekäsittelyä soluja pidettiin jäällä 5 minuuttia 1,5 % naudan sikiön seerumissa vasta-aineiden epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Tämän jälkeen solut resuspensoitiin 100 µl:aan vasta-aine-EPICS I -liuokseen. Tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet ja niiden käyttöläimennokset on esitetty taulukossa 1. Vasta-aineiden annettiin sitoutua 20-30 minuuttia (+4 °C, valolta suojattuna). Solut pelletöitiin (500 x g) ja sitoutumattomat vasta-aineet pestiin pois EPICS I:llä (250 µl/kaivo). Pesut tehtiin kahdesti ja pesujen välissä solut pelletöitiin (500 x g). Lopuksi solut fiksattiin EPICS fix -liuoksella (liite 1) ja värjätyt solunäytteet säilytettiin +4 °C:ssa. Näytteet analysoitiin LSRFortessa-virtaussytometrillä (BD Biosciences) yleensä vuorokauden kuluessa värjäyksestä. Data analysoitiin FlowJo-ohjelmalla (versio 10, Treestar Inc.).

**Taulukko 1.** Virtaussytometriassa käytetyt fluorokromikonjugoidut vasta-aineet.

Antigeeni	Fluorokromi	Isäntäeläin	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos-suhde
<b>LIN*</b>	APC	rotta	BD Pharmingen, 51-9003632	1:100
<b>SCA-1</b>	PE	rotta	R&D Systems, FAB1226P	1:200
<b>CD117 (C-KIT)</b>	BV510 PerCP-Cy5.5	rotta	BioLegend, 135119 BD Pharmingen, 560557	1:200
<b>CD34</b>	PerCP-Cy5.5 A647	hamsteri rotta	BioLegend, 128607 BD Pharmingen, 560230	1:200
<b>CD41</b>	FITC	rotta	BD Pharmingen, 561849	1:200
<b>CD135</b>	BV421	rotta	BD Pharmingen, 562898	1:200
<b>CD127 (IL-7RA)</b>	PE-Cy7	rotta	BD Pharmingen, 56733	1:200
<b>CD45</b>	APC-Cy7	rotta	BD Pharmingen, 557659	1:200

\*= Sisältää 5 APC-konjugoitua vasta-ainetta, jotka tunnistavat hiiren luuytimen erilaistuneet myeloidiset ja lymfoidiset solut virtaussytometrialla.

### 2.3 Pesäkkeenmuodostuskokeet

Pesäkkeenmuodostuskokeilla havainnoidaan solujen jakautumiskykyä. Kun kudoksesta eristettyjä soluja kasvatetaan kantasoluille suotuisissa olosuhteissa ja pesäkkeitä muodostuu, voidaan olettaa, että pesäkkeet ovat lähtöisin kudoksen kantasoluista.

#### 2.3.1 Kudosten keräys ja käsittely pesäkkeenmuodostuskoetta varten

Pesäkkeenmuodostuskokeessa kudoksen rakenne hajotetaan mekaanisesti solususpensioksi, suspensio sekoitetaan kasvatusmatriksiin ja solujen annetaan proliferoitua optimaalisissa olosuhteissa useiden päivien ajan. Tässä tutkimuksessa kasvatusmatriksina käytettiin kaupallista metyyliiselluloosapohjaista geeliä (Methocult GF M3434, Stemcell Technologies), joka sisältää sytokiinejä ja muita solujen kasvuun ja lisääntymiseen tarvittavia aineita. Kasvatusmatriksin koostumus on optimoitu siten, että siinä kasvaa luuytimeistä, sikiöaikaisesta maksasta, verestä ja pernasta peräisin olevat hematopieettiset kantasolut sekä niiden progenitori- eli esisolut.

Pesäkkeenmuodostuskokeissa käytettiin vastasyntyneiden urosten kiveksistä, aivoista ja maksasta eristettyjä soluja. Kullakin koekerralla kivekset kerättiin kaikilta uroksilta ja

maksa ja aivot vain yhdeltä vastasyntyneeltä hiireltä. Vastasyntyneen kivekset (2 kpl) yhdistettiin yhdeksi näytteeksi. Koe tehtiin myös kerran urosalkioilla (E14,5), joilta kerättiin samat kudokset kuin vastasyntyneiltäkin. Kahden alkion kivekset (4 kpl) yhdistettiin aina yhdeksi näytteeksi. Kudokset preparoitiin 24-kuoppalevyille 900 µl:aan kylmää HBSS-liuosta. Kudokset hajotettiin mekaanisesti pipetoimalla suspensiota edestakaisin, minkä jälkeen maksa- ja aivosolususpensiot suodatettiin silkkikankaan (tiheys 77 µm) läpi. Maksa- ja aivosolut laskettiin automaattisella solulaskurilla (Cellometer™ AutoT4) ennen kuin ne laitettiin kasvatusmatriksiin. Koska kivesnäytteiden solumäärän tiedettiin aikaisempien testien perusteella olevan vähäinen verrattuna maksa- ja aivonäytteiden solumääriin, kivesnäytteitä ei suodatettu eikä solumääriä laskettu, vaan solut pelletöitiin (1000 x g) ja resuspensoitiin suoraan kasvatusmatriksiin.

### 2.3.2 Pesäkkeiden kasvatus ja niiden havainnointi

Noin 5000 maksa- tai aivosolua sekä kiveksistä eristetyt solut pipetoitiin 1,3 ml:aan kasvatusmatriksia ja sekoitettiin huolellisesti homogeeniseksi seokseksi. Suspensio siirrettiin ruiskulla ilmakuplia välttämällä pienille petrialjoille (Ø 35 mm), petrialjat peitettiin kannella ja maljat laitettiin isolle petrialjalle (Ø 100 mm) siten, että yhdessä isossa petrialjassa oli aina kaksi pientä, soluja sisältävää maljaa ja yksi pieni, avoin petrialja, jossa oli PBS:ää tai MilliQ-vettä kosteuden ylläpitämiseksi. Solujen annettiin proliferoitua solukasvatuskaapissa (+37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kymmenen päivää. Jokaisessa kokeessa oli mukana vähintään kaksi kives- tai maksasoluja sisältävää maljaa ja yksi aivosoluja sisältävä malja. Koe toistettiin kolme kertaa vastasyntyneillä ja kerran E14,5 alkioilla.

Maljoilla kasvaneet pesäkkeet laskettiin ensin silmämääräisesti valomikroskoopilla (Olympus CKX31) ja tämän jälkeen pesäkkeet kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla (EVOS Cell Imaging System) 8 ja 10 päivää kokeen aloittamisesta. Pesäkkeeksi laskettiin solupesäke, joka sisälsi yli 30 solua. Pesäkkeiden kasvua analysoitiin tilastollisesti GraphPad Prism-ohjelmalla (versio 8.0.1) ja mikroskooppikuvista havainnoitiin pesäkkeiden koko ja rakenne CorelDRAW-vektorigrafiikkaohjelmalla (versio 20.0).

## 2.4 Whole mount -värjäykset

Tässä pro gradu -työssä whole mount -menetelmällä haluttiin yhtäältä todentaa hematopoieettisten kantasolujen olemassaolo ja toisaalta selvittää niiden sijainti hiiren kiveksessä. Whole mount -menetelmässä kudospala tai kokonainen kudokse värjätään vasta-aineilla, minkä jälkeen kudokse kirkastetaan ja kudoksen rakenne kuvataan kolmiulotteisesti. Whole mount -menetelmä eroaa esimerkiksi perinteisestä parafiini- tai jääleikkeiden värjäyksestä siinä, että whole mount -tekniikalla värjätään ja kuvataan paksuja kudospaloja toisin kuin perinteisillä tekniikoilla.

### 2.4.1 Tuoreiden whole mount -näytteiden keräys ja käsittely

Whole mount -tekniikkaa käytettiin vastasyntyneiden ja alkioden kivesten, alkioden maksan sekä kokonaisen E10,5 ikäisen hiiren alkion värjäämiseen. Kaikki kivesnäytteet ja osa maksanäytteistä kerättiin tuoreena värjäyksiä varten, mutta muutama maksavärjäys tehtiin pakastetuista (-20 °C), korkeintaan 3 vuotta 100 % metanolissa säilytetyistä näytteistä. E10,5 alkio, joilta oli poistettu sikiökalvot ja oikeanpuoleinen ihokerros, oli kerätty aikaisemmin (vuodesta 2016 eteenpäin) ja säilytetty pakastimessa (-20 °C) 100 % metanolissa. E10,5-ikäiseltä hiiren alkioilta värjättiin aortta-gonadi-mesonefros- eli AGM-rakenne.

Vastasyntyneiden hiirten ja hiirten alkioden kivekset preparoitiin 24-kuoppalevyille PBS:ään ja fiksoitiin 20–30 minuuttia jäällä 2 % paraformaldehydissä (Santa Cruz Biotechnology). Maksa preparoitiin RPMI-mediumiin (Sigma), joka sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia (*engl.* fetal bovine serum, FBS, Biowest). Maksa paloiteltiin skalpellilla ja maksapalat inkuboitiin tunnin kylmässä hepariini-RPMI-FBS -mediumissa. Hepariniin (LEO) pitoisuus mediumissa oli 167 IU/ml. Heparinikäsittelyn tarkoituksena oli päästä eroon ylimääräisestä verestä. Heparinikäsittelyn jälkeen kudokset pestiin PBS:llä kolme kertaa 10 minuuttia heiluttajassa +4 °C:ssa. Pesujen jälkeen kudokset dehydroitiin eli niistä poistettiin vesi nousevassa metanolisarjassa. Kudokset pidettiin 5-30 minuuttia 50 % metanoli-PBS-liuoksessa ja 5-30 minuuttia 100 % metanoliliuoksessa, joka vaihdettiin vähintään kerran uuteen 100 % metanoliin. Inkubaatioaika määräytyi kudoksen koon perusteella. Lopuksi kudokset siirrettiin kryoputkeen 100 % metanoliin ja säilytettiin -20 °C:ssa.

## 2.4.2 Whole mount -näytteiden vasta-ainevärjäykset

Vasta-ainevärjäyksissä käytettiin epäsuoraa ja suoraa menetelmää. Epäsuorassa menetelmässä toisiovasta-aine on leimattu fluorokromilla, suorassa menetelmässä fluorokromi on liitetty ensiövasta-aineeseen eikä toisiovasta-ainetta tarvita ollenkaan. Vasta-ainevärjäykset tehtiin 96-kuoppalevyllä 100 µl:ssa PBS-BSA-T -liuosta. Vasta-aineet ja niiden käyttöpitoisuudet on koottu taulukoihin 2-4.

Immunofluoresenssivärjäyksissä käytettiin hematopoeettisten kantasolujen antigeenin tunnistavaa Sca-1 vasta-ainetta, jota ei ollut aikaisemmin käytetty tutkimusryhmässä. Tästä syystä vasta-aineen käyttöpitoisuus oli ensin optimoitava. Muut käytetyt vasta-aineet on aikaisemmin testattu ja niiden käyttöpitoisuudet optimoitu. Sca-1 optimointi tehtiin värjäämällä kivesnäytteitä kolmella eri vasta-aine konsentraatiolla: 2,5 µg/ml, 10 µg/ml ja 25 µg/ml. Varsinaisiin värjäyksiin valittiin pienin pitoisuus 2,5 µg/ml, sillä fluoresenssin intensiteetti vaikutti olevan sama kaikissa testatuissa konsentraatioissa, joten oli mielekästä valita pienin toimiva pitoisuus.

Ennen värjäyksiä kudokset rehydroitiin kylmässä 50 % metanolissa 5–30 minuuttia, kylmässä PBS:ssä 5-30 minuuttia ja lopuksi tuoreessa PBS-liuoksessa. Vasta-ainevärjäyksiä varten valmistettiin PBS-BSA-T-liuos, joka sisälsi 0,5 % naudan seerumin albumiinia eli BSA:ta (*engl.* bovine serum albumin, Biowest) ja 0,4 % tritonia (Triton X-100, Sigma). Ennen värjäystä vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen estettiin inkuboimalla kudoksia 45 min - 5 tuntia PBS-BSA-T:ssä, joka sisälsi 1 % vuohen seerumia (*engl.* normal goat serum, NGS) ja 0,5 % FBS:ää. Alle tunnin inkubaatiot tehtiin aina huoneenlämmössä, muutoin +4 °C:ssa.

Kudokset inkuboitiiin aina kaikissa eri vasta-aineissa yön yli +4 °C:ssa. Epäsuorassa menetelmässä sitoutumaton ensiövasta-aine pestiin pois 3-6 tuntia kylmällä PBS-BSA-T:llä ennen toisiovasta-aineen lisäämistä. Pesun aikana PBS-BSA-T vaihdettiin ainakin kahdesti. Fluorokromikonjugoidun vasta-aineinkubaation jälkeen kudokset pestiin vielä kolmesti 1-2 tuntia kylmällä PBS-BSA-T:llä ja kolmesti 20 minuuttia PBS-T:llä (PBS + 0,4 % Triton), jotta päästiin eroon BSA:sta. Jos värjäyksessä käytettiin Hoechst 33342-tumavärjäystä (Thermo Scientific), se lisättiin viimeisen PBS-T-pesun yhteydessä (4 µM). PBS-T-pesujen jälkeen näytteistä poistettiin nestettä ensin kylmällä 50 % metanolilla (metanoli-PBS-liuos) 5-30 minuutin ajan, minkä jälkeen näytteitä pidettiin kylmässä 100 % metanolissa 5-30 minuuttia ennen kirkastusta.

**Taulukko 2.** Immunofluoresenssivärjäyksissä käytetyt ensiövasta-aineet.

Antigeeni	Osoitettava kudosis	Isäntä-eläin	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos-suhde
<b>SCA-1 /LY6</b>	Hematopoeettiset kantasolut	Vuohi	R&D Systems, AF1226	1:400
<b>CD117 /C-KIT</b>	Hematopoeettiset kantasolut	Rotta	BD Pharmingen, 553352	1:150
<b>LYVE-1</b>	Imusuonten endoteeli	Kani	Relia Tech GmbH, 103-PA50	1:50
<b>CD31</b>	Verisuonten endoteeli	Rotta	BD Pharmingen, 553370	1:150
<b>TER119</b>	Punasolut	Rotta	BD Pharmingen, 550565	1:100
<b>SOX9</b>	Sertolin solut	Kani	EMD Millipore, AB5535	1:400

**Taulukko 3.** Immunofluoresenssivärjäyksissä käytetyt toisiovasta-aineet.

Fluorokromi	Isäntäeläin	Kohde-eläin	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos-suhde
<b>A488</b>	Kani	Vuohi	Thermo Scientific A27012	1:1000
<b>A546</b>	Vuohi	Rotta	Life technologies A11081	1:1000
<b>A647</b>	Aasi	Vuohi	Life Technologies A21447	1:500
<b>A647</b>	Vuohi	Kani	Invitrogen A27040	1:500
<b>A647</b>	Kana	Rotta	Life technologies A21472	1:500
<b>DyLight 405</b>	Vuohi	Kani	Thermo Scientific 35551	1:500

**Taulukko 4.** Immunofluoresenssivärjäyksissä käytetty suorakonjugoitu vasta-aine.

Antigeeni & fluorokromi	Osoitettava kudosis	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos-suhde
<b>CD144-A647</b>	VE-kadheriini, eli verisuonten endoteeli	BD Pharmingen 562242	1:250

#### 2.4.3 Whole mount -näytteiden kirkastaminen ja kudosten kuvantaminen

Fluoresenssimikroskopointia varten näytteet kirkastettiin nesteenoiston jälkeen lähes läpinäkyviksi. Kirkastaminen tehtiin 50 % ja 100 % bentsyylialkoholi-bentsyylibentsoaattiliuoksilla (BABB). 100 % BABB-liuos valmistettiin yhdistämällä 1 osa bentsyylialkoholia (Honeywell) ja 2 osaa bentsyylibentsoaattia (Sigma-Aldrich). 50 % BABB valmistettiin sekoittamalla 1 osa 100 % BABB-liuosta ja 1 osa 100 % metanolia. Näytteet kirkastettiin lasipohjaisilla 35 mm petrimaljoilla vähintään 10 minuuttia 50 % BABB-metanoliliuoksessa, minkä jälkeen tilalle vaihdettiin 100 %

BABB-liuos. 100 % BABB-liuos vaihdettiin uuteen liuokseen 10-30 minuutin välein niin monta kertaa, että kudospala kirkastui. BABB-liuosta pipetoitiin näytteen päälle kerrallaan 100 µl. Alkioiden kivesnäytteille riitti yksi 100 % BABB-käsittely, kun taas maksapaloja kirkastettiin vaihtamalla 100 % BABB jopa 8 kertaa, eivätkä maksapalat silti kirkastuneet aina kauttaaltaan.

Kun näytteet olivat kirkastuneet, ne jätettiin 100 % BABB-liuokseen ja kudokset peitettiin peitinlasilla. Näytteitä säilytettiin +4 °C:ssa valolta suojattuna. Näytteet pyrittiin kuvaamaan mahdollisimman pian kirkastuksen jälkeen, yleensä muutaman päivän kuluessa. Näytteet kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (3i, Intelligent Imaging Innovations) ja kuvat analysoitiin ImageJ-kuvankäsittelyohjelmalla.

### 3. TULOKSET

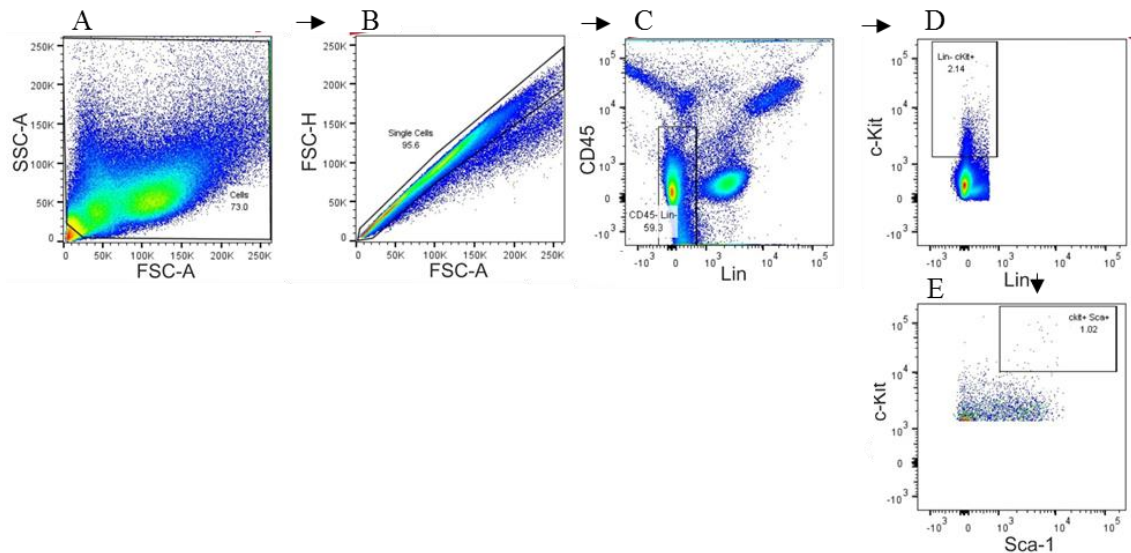
#### *3.1 Kivesten kantasolupopulaatioiden virtausytometrinen analyysi*

Virtausytometrillä selvitettiin hiiren kiveksen solujen erilaistumisaste ja se, onko kehittyvässä kiveksessä hematopoieettinen kantasolupopulaatio. Solut voidaan luokitella ominaisuuksiltaan erilaisiin ryhmiin eli populaatioihin pinta-antigeenien perusteella. Solujen luokittelua pintaproteiinien avulla kutsutaan immunofenotyypitykseksi.

##### 3.1.1 Virtausytometrisen analyysiprosessin malli

Solupopulaatiot analysoitiin FlowJo-ohjelmalla valon sirontaominaisuuksien ja vasta-aineiden fluoresenssin perusteella. Valon sivu- (SSC) ja suorasiironnan (FCS) perusteella erotettiin elävät ja kuolleet solut (kuva 10, A) sekä yksittäiset solut jakautumassa olevista ja soluaggregaateista (kuva 10, B). Analyysiä jatkettiin rajaamalla tarkastelun kohteeksi erilaistumattomat solut kuten kantasolut eli solupopulaatio, joka oli negatiivinen leukosyyttien yleisantigeenin CD45 sekä erilaistuneiden verisolujen markkereiden (Lin<sup>-</sup>) suhteen (Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> -tuplanegatiivinen populaatio). Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> -soluista lopulliseen tarkasteluun rajattiin kantasolumarkkeerien c-Kit (CD117) ja Sca-1 suhteen tuplapositiivinen solupopulaatio (c-Kit/CD117<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>) (kuva 10, D ja E). Tämä populaatio sisälsi hematopoieettisia kantasoluja, T- ja B-solujen esiasteita sekä myelooisen ja erytroidisen linjan esiastesoluja.

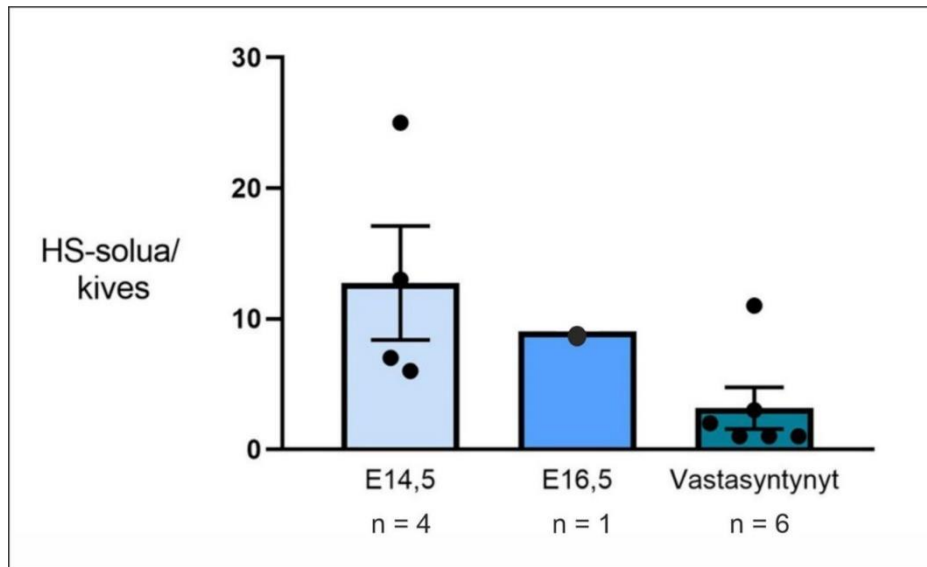




**Kuva 10. Solupopulaatiot rajattiin analyysiprosessin mallin mukaisesti.** Soludebris ja toisiinsa takertuneet solut suljettiin pois (A ja B), minkä jälkeen tarkasteltiin vain erilaistumattomia soluja. Näistä soluista valittiin tarkasteltavaksi hematopoeettiset kantasolut (D ja E). Tässä esimerkkikuvaajassa solupopulaation rajaus on tehty vastasyntyneen hiiren kiveksen soluilla.

### 3.1.2 Hiiren kehittyvässä kiveksessä on hematopoeettisia kantasoluja

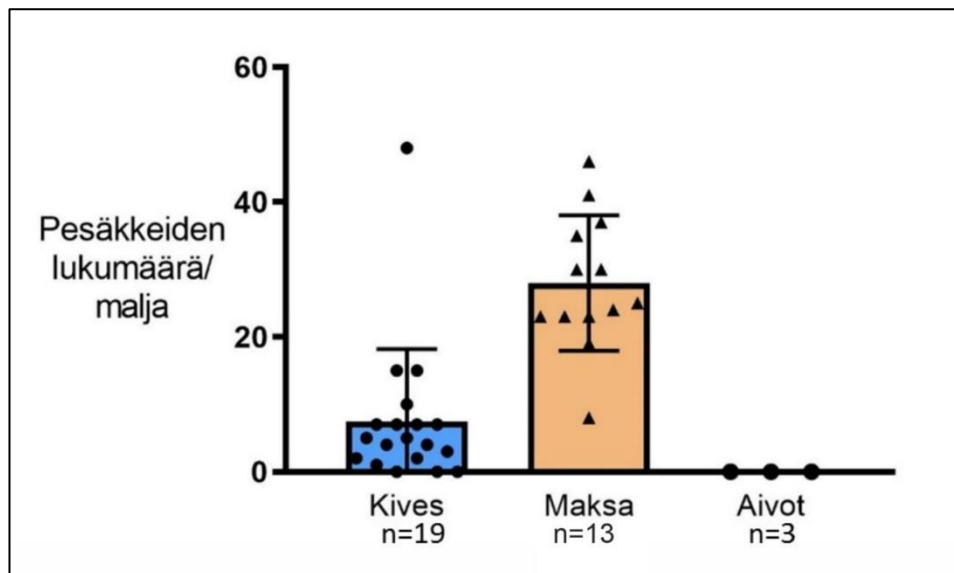
Virtausytometrian perusteella hiiren alkion kives sisältää hematopoeettisia kantasoluja (kuva 11). E14,5 alkioiden kiveksessä hematopoeettisia kantasoluja on noin 5-25 kpl/kives ja E16,5 alkioilla noin 10 kpl/kives. Vastasyntyneen hiiren kiveksessä on keskimäärin alle viisi hematopoeettista kantasolua. Kussakin näytteessä on mukana useampi kives, joten kivesten lukumäärä huomioitiin, kun hematopoeettisten kantasolujen kokonaismäärä määritettiin per kives. Kaiken kaikkiaan hematopoeettisten kantasolujen määrä hiiren kiveksessä oli odotusten mukainen (erittäin alhainen) kaikissa tutkituissa ikäpisteissä.



**Kuva 11. Hematopoieettisten kantasolujen (HS-solut) lukumäärä hiiren kiveksen eri kehitysvaiheissa.** Alkioikäisen hiiren kiveksessä hematopoieettisia kantasoluja on enemmän, kuin vastasyntyneen hiiren kiveksessä. Kaiken kaikkiaan hematopoieettisten kantasolujen määrä hiiren kiveksessä on hyvin alhainen kaikissa tutkituissa ikäpisteissä. Jokaisen yksittäisen kokeen (●) solumäärä on jaettu kokeessa käytettyjen kivesten lukumäärällä (HS-solua/kives).

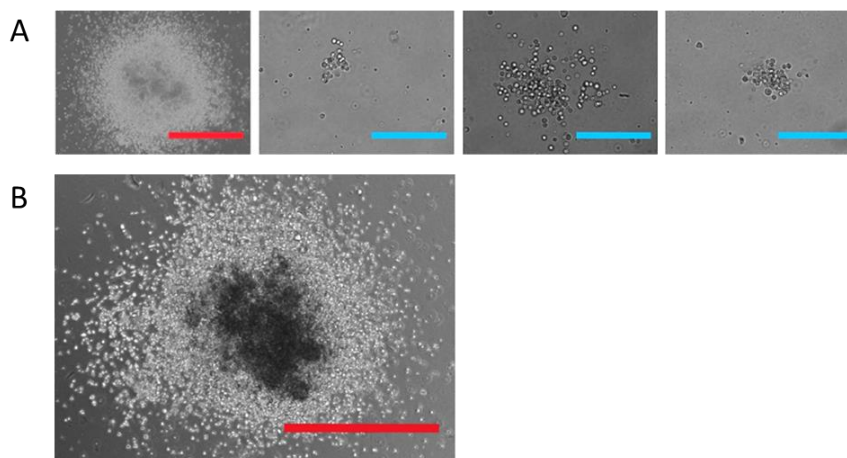
### 3.2 Vastasyntyneen hiiren pesäkkeenkasvatuskokeet

Seuraavaksi haluttiin selvittää pesäkkeenmuodostuskokeilla, onko kehittyvässä kiveksessä toiminnallisia eli proliferoivia hematopoieettisia kantasoluja. Elinkykyisten hematopoieettisten kantasolujen tulisi muodostaa pesäkkeitä puolikiinteässä metyyliiselluloosamediumissa, kun niitä stimuloidaan erilaisilla kasvutekijöillä. Kantasoluviljelyiden perusteella vastasyntyneen hiiren kives sisältää proliferaatiokykyisiä hematopoieettisia kantasoluja tai niiden progenitorisoluja (kuva 12). Lähes jokaisella kivessoluja sisältävällä maljalla kasvoi pesäkkeitä, keskimäärin 7 pesäkettä per malja.



**Kuva 12.** Vastasyntyneen hiiren kiveksessä ja maksassa on toiminnallisia hematopoeettisia kantasoluja tai niiden progeniittorisoluja. Pesäkkeiden määrä maljalla 8 päivän kasvatuksen jälkeen. Suurin osa kivesmaljoista sisälsi alle 10 pesäkettä, kun taas maksamaljoilla oli yleensä 20-40 pesäkettä. Negatiivisena kontrollikudoksena pesäkemuodostuskokeessa käytettiin vastasyntyneen hiiren aivoista eristettyjä soluja. (●, ▲ = n= maljojen lukumäärä).

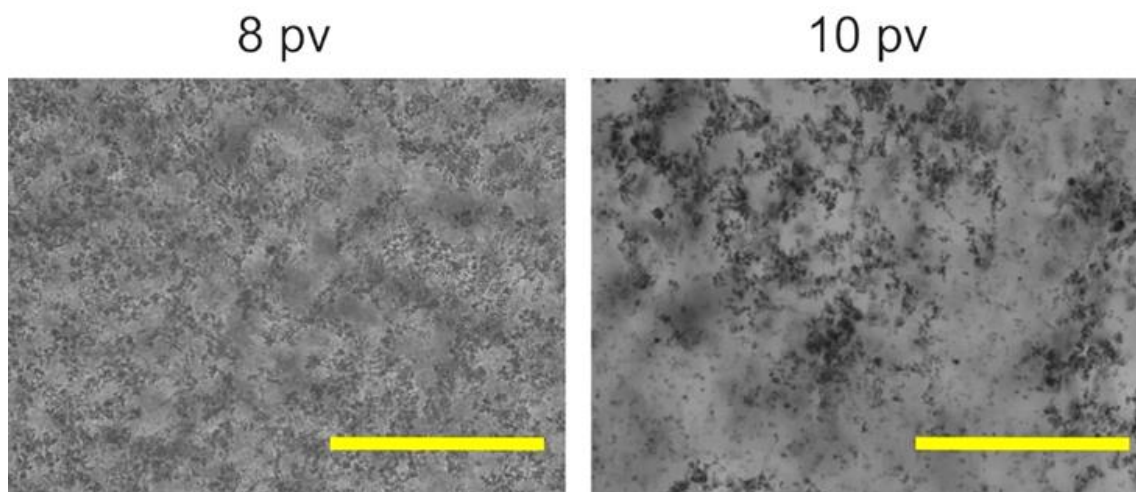
Kivespesäkkeiden morfologia vaihteli, mutta ne olivat enimmäkseen värittömiä ja pieniä, halkaisijaltaan alle 200 µm (kuva 13, A). Myös vastasyntyneen hiiren maksasoluja sisältävillä maljoilla kasvoi pesäkkeitä jokaisella koekerralla. Kahdeksan päivää kasvatuksen aloittamisesta maksasolumaljoilla oli keskimäärin 30 pesäkettä/malja. Pesäkkeet olivat tummia, usein punertavia sekä suuria, halkaisijaltaan yli 2000 µm (kuva 13, B).



**Kuva 13.** Vastasyntyneen hiiren kiveksen ja maksan hematopoeettisista kantasoluista muodostuneita pesäkkeitä. Kivespesäkkeiden ulkomuoto vaihteli todella suurikokoisista pesäkkeistä pieniin (A). Maksan hematopoeettisista kantasoluista muodostuneet pesäkkeet olivat suuria ja tummia, usein jopa punertavia (B). Mittajanat: punainen 1000 µm ja sininen 200 µm.

Kun pesäkkeiden annettiin kasvaa kymmenen päivää, niitä oli sekä maksa- että kivesmaljoilla selkeästi enemmän kuin kahdeksan päivän jälkeen. Kiveksen hematopoeettisista kantasoluista muodostuneita pesäkkeitä oli keskimäärin 9 ja maksan hematopoeettisista kantasoluista muodostuneita pesäkkeitä oli keskimäärin 45 (tuloksia ei esitetty). Tulokset viittaavat siihen, että vastasyntyneen hiiren kiveksessä olisi toiminnallisia hematopoeettisia kantasoluja. Koska aivoissa ei ole erilaistumattomia kantasoluja, hiiren aivoista eristetyt solut eivät muodostaneet pesäkkeitä missään aikapisteessä.

Pesäkkeenmuodostuskoe tehtiin kerran myös alkion (E14,5) kiveksistä eristetyillä soluilla. Alussa soluja kasvoi maljoilla harvakseltaan eikä niillä havaittu silmämääräisesti solupesäkkeitä. Mikroskoopilla tarkasteltuna näkyi vain yksittäisiä soluja siellä täällä geelimatriksin joukossa. Kahdeksantena kasvatuspäivänä kivesmaljoilla ei ollut havaittavissa selkeitä, laskettavissa olevia solupesäkkeitä, mutta maljat olivat täynnä soluja (kuva 14). Kymmenen päivää kasvatuksen jälkeen maljat olivat edelleen täynnä soluja, mutta osa soluista oli selvästi huonokuntoisia (kuva 14). Vaikka tässä alkioikäisten hiirten kiveksillä kerran tehdyssä kokeessa ei varsinaisia pesäkkeitä ollutkaan laskettavissa, niin solut proliferoivat ja on mahdollista, että osa soluista on hematopoeettisia kantasoluja tai progenitorisoluja.



**Kuva 14. E14,5-ikäisten alkoiden kiveksillä tehdyillä pesäkemaljoilla ei kasvanut selkeitä solupesäkkeitä. Sekä 8. että 10. kasvatuspäivän kohdalla maljat olivat täynnä soluja ja soludebristä. Mittajana 400  $\mu$ m.**

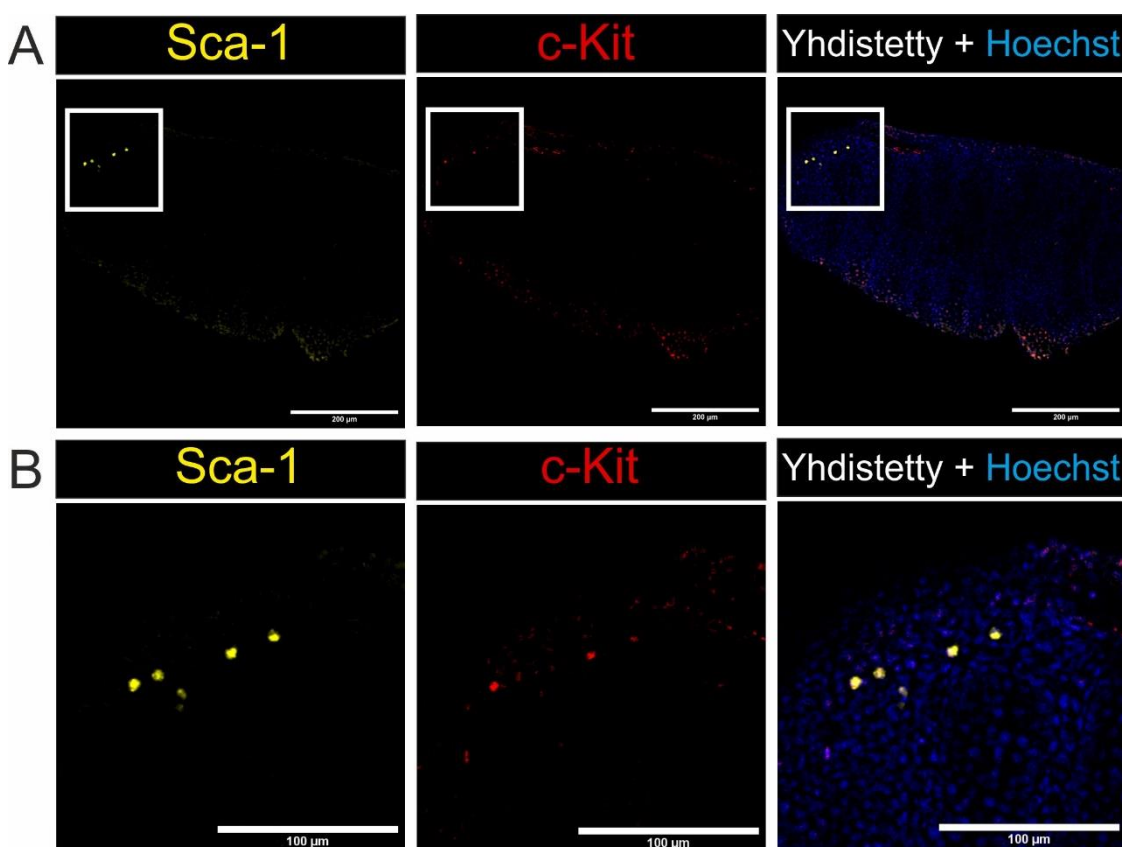
Sen sijaan alkion maksasoluja sisältäneillä maljoilla pesäkkeitä kasvoi saman verran kuin vastasyntyneen hiiren maksasoluilla tehdyillä kokeilla eli noin 20-40 kpl/malja. E14,5 alkoiden aivoista eristetyt solut eivät muodostaneet pesäkkeitä.

### 3.3 Hematopoieettisten kantasolujen immunohistokemiallinen analyysi

Whole mount -värjäyksillä haluttiin selvittää hematopoieettisten kantasolujen lokalisaatio kiveksessä. Whole mount -värjäys on erittäin haastava menetelmä eikä tilannetta auttanut se, että virtaussytometritulosten perusteella kiveksissä olisi vain joitakin kymmeniä soluja per kives.

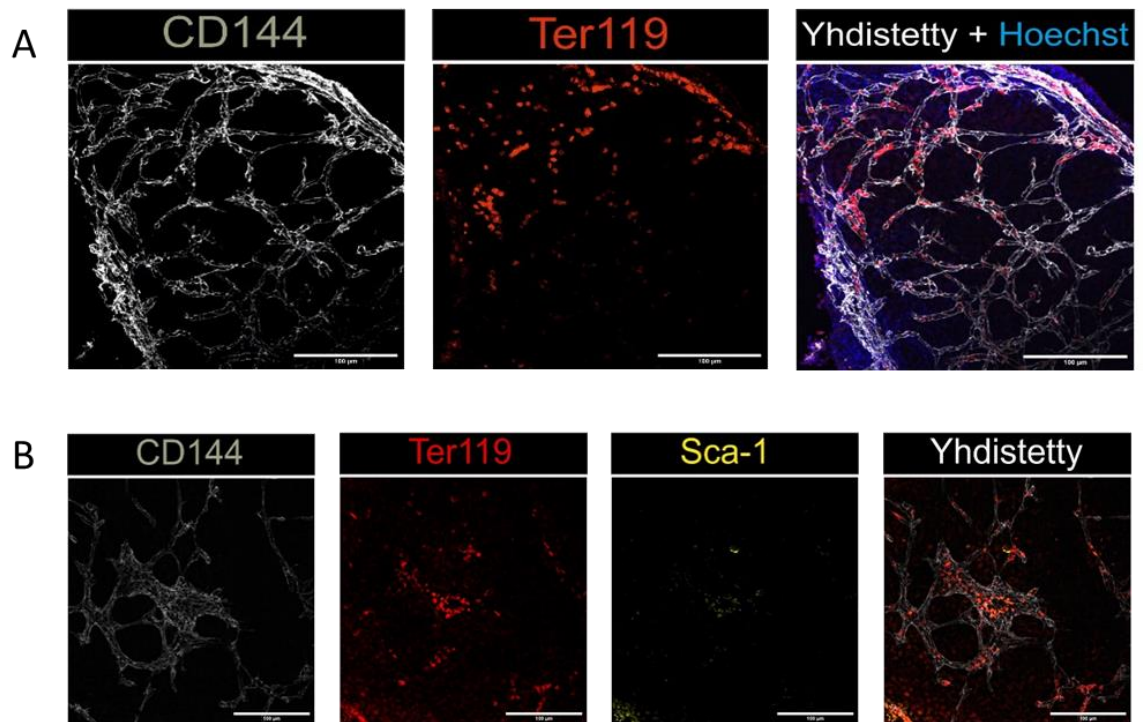
#### 3.3.1 Kehittyvän kiveksen hematopieettiset kantasolut

Alkioikäisen (E14,5) hiiren kivekset värjättiin hematopoieettisten solujen pinnan antigeeneihin sitoutuvilla Sca-1 ja c-Kit vasta-aineilla. Kuvasta 15 havaitaan alkion kiveksessä muutamia Sca-1/c-Kit positiivisia soluja, mikä viittaa vahvasti siihen, että nämä solut olisivat kantasoluja. Soluja havaittiin vain muutamia, mikä tukee virtaussytometrialla saatuja tuloksia.



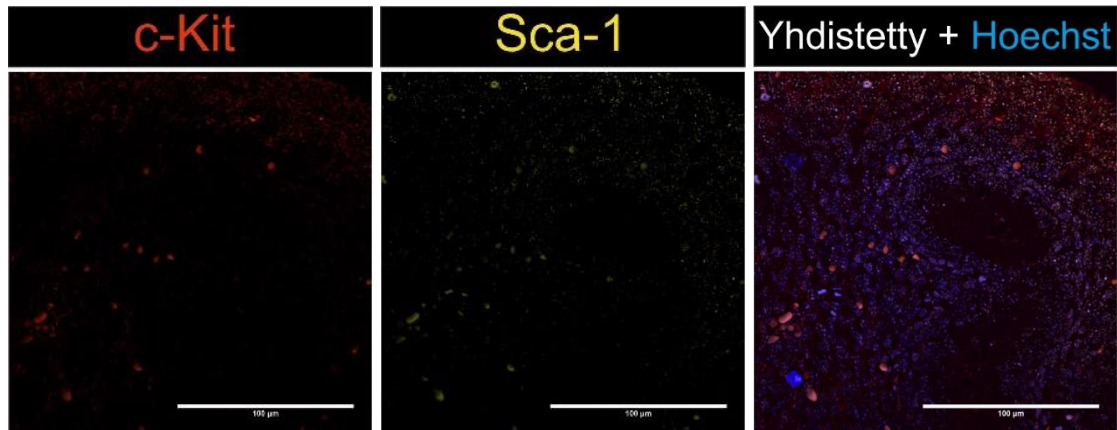
**Kuva 15.** E14,5 -ikäisen hiiren kiveksessä on muutamia hematopieettisia kantasoluja. A. 20 x suurennoksessa on muutama c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> solu. Mittajana 200 μm. B. Kuvat ovat suurennoksia A-kohdan valkoisten neliöiden rajaamasta alueesta. Mittajana 100 μm. Oikeanpuoleisissa kuvissa mukana Hoechst-tumaväri rakenteen havainnollistamiseksi.

Immunohistokemiallisissa värjäyksissä punasolujen autofluoresenssi voi vaikeuttaa tai jopa vääristää tulosten tulkintaa. Punasolujen laajan autofluoresenssispektrin emissiohuippu (500 nm) on osittain päällekkäinen Sca-1 värjäyksissä käytetyn Alexa488 toisiovasta-aineen emissiospektrin (530/30 nm) kanssa. Jotta autofluoresenssin mahdollisuus voitiin poissulkea, alkion kives värjättiin ensiksi punasolut tunnistavalla Ter119-vasta-aineella sekä verisuonten endoteelisolujen VE-kadheriinin tunnistavalla CD144-vasta-aineella. Ter119-positiiviset punasolut lokalisoituivat selkeästi CD144-positiivisten verisuonten sisälle (kuva 16, A). Kun kivekset värjättiin punasolut, verisuonet ja hematopoieettiset kantasolut tunnistavilla vasta-aineilla (Ter119, CD144, Sca-1 ja c-Kit), vahva positiivinen signaali saatiin ainoastaan punasoluista ja verisuonista. Sca-1 vasta-aineen antama signaali oli hyvin heikko (kuva 16, B), eikä c-Kit positiivisia soluja havaittu ollenkaan.



**Kuva 16. E14,5 -ikäisen hiiren kiveksen verisuonten ja punasolujen vasta-ainevärjäys. A.** Ter119-positiiviset punasolut erottuvat selkeästi CD144-positiivisten verisuonten sisällä. Yhdistetyssä kuvassa näkyy myös tumien värjäystyminen (Hoechst) **B.** E14,5-ikäisen hiiren kiveksessä voidaan havaita intensiteetiltään heikko Sca-1 signaali. Punasolut ovat selkeästi nähtävissä verisuonten sisällä. Mittajana 100 µm.

E16,5-ikäisen hiiren kiveksessä ei havaittu lainkaan soluja, jotka olisivat ilmentäneet Sca-1/c-Kit kantasolumarkkeereita (kuva 17). Vaikka kiveksessä näyttää olevan Sca-1-positiivisia soluja, intensiteetti on melko heikko, ja selkeitä päätelmiä kantasolujen olemassaololle ei tästä värjäyksestä voida tehdä.

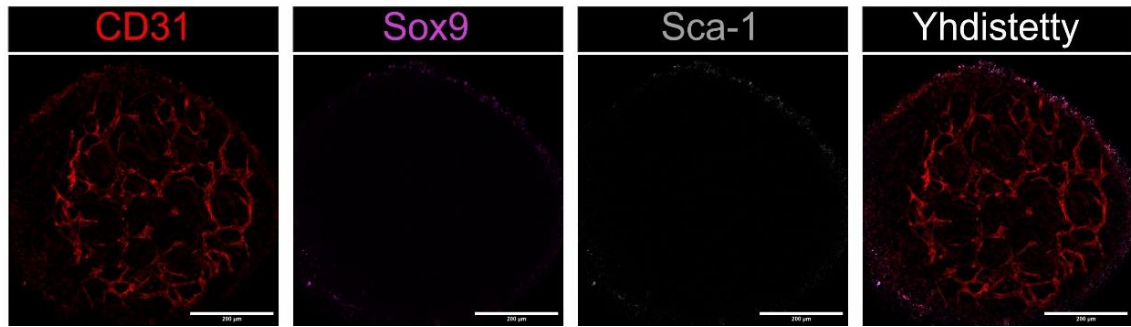


**Kuva 17. E16,5 -ikäisen hiiren kiveksessä ei ole havaittavissa hematopieettisia kantasoluja whole mount –värjäyksessä. Oikeanpuoleisessa kuvassa mukana Hoechst-maväri rakenteen havainnollistamiseksi. Mittakaava 100 µm.**

### 3.3.2 Vastasyntyneen hiiren kiveksen immunohistokemiallinen analyysi

Kantasolut yritettiin havainnoida Sca-1 vasta-aineella myös vastasyntyneen hiiren kiveksestä. Tarkoituksena oli myös lokalisoida mahdolliset Sca-1 positiiviset solut, joten kiveksen verisuonet värjättiin CD31 vasta-aineella ja siementiehyet värjättiin Sertolin solut tunnistavalla Sox9 vasta-aineella. CD31 verisuonimarkkeeria käytettiin alkiovärjäyksissä mukana olleen CD144:n sijaan. Alkioiden verisuonet havainnoitiin suorakonjugoidulla CD144 vasta-aineella, sillä CD31 vasta-aine, jolla yleensä havainnoidaan verisuonet, oli samasta isäntäeläimestä kuin c-Kit. Koska vastasyntyneen kiveksiä ei värjätty c-Kit vasta-aineella, voitiin CD31 vasta-ainetta käyttää vastasyntyneen kivesvärjäyksissä.

Kuten kuvasta 18 nähdään, vastasyntyneen hiiren kiveksen verisuonten havainnointi CD31 vasta-aineella onnistui hyvin. Sekä Sca-1 että Sox9 vasta-aineet sitoutuivat epäspesifisesti kiveskalvoon, mikä viittasi siihen, etteivät vasta-aineet penetroituneet kunnolla whole mount -menetelmällä käsiteltyyn kudokseen. Vasta-aineiden läpäisevyyttä yritettiin parantaa leikkaamalla skalpellilla vastasyntyneen hiiren kiveksestä pieni palanen pois. Leikkaaminen ei merkittävästi parantanut värjäystuloksia.



**Kuva 18.** Vastasyntyneen hiiren kiveksessä ei ole havaittavissa hematopieettisia kantasoluja whole mount –värjäyksessä. Verisuonien värjäys CD31 vasta-aineella on onnistunut hyvin. Sertolin solut värjäävä Sox9 tai sen sekundaarivasta-aine on jäänyt kiveksen *tunica albugineaan*, eikä ole läpäissyt kiveksen ulointa kuorta. Sca-1 on tarttunut Sox9:ään tai sen sekundaarivasta-aineeseen. Mittakaava 200 µm.

### 3.3.3 Hiiren alkioden AGM-rakenteen ja maksan immunofluoresenssivärjäykset

Koska kivesten kantasolujen värjäystulokset olivat tulkinnanvaraisia, haluttiin vasta-aineiden toimivuus tarkistaa hiiren maksanäytteillä. Hiiren alkion maksassa sekä ns. AGM-rakenteessa tiedetään varmuudella olevan hematopieettisia kantasoluja tietyssä kehitysvaiheessa. Värjäyksissä käytettiin vuonna 2016 preparoituja hiiren alkion (E14,5) maksoja. Näiden maksanäytteiden värjäykset eivät toimineet, sillä millään kokeilluista vasta-aineista ei havaittu positiivista värjäytymistä. Näytteenoton yhteydessä maksoja ei oltu heparinisoitu, mikä voi selittää sen, ettei näytteistä saatu positiivisia värjäystuloksia. Tämän vuoksi päädyttiin preparoimaan E14,5 alkioista tuoreet maksanäytteet, jotka myös heparinisoitiin. Maksan imusuoniepiteeli värjättiin LYVE-1 vasta-aineella ja kahdella eri toisiovasta-aineella, A647 ja DyLight405. Näistä ainoastaan A647 toimi värjäyksissä. Vaikka maksan rakennevärjäys onnistui, hematopieettisia kantasoluja ei E14,5-ikäisen hiiren maksasta havaittu.

Myöskään E10,5 alkion AGM-rakenteen värjäys ei onnistunut. Alkiosta yritettiin värjätä ainoastaan hematopieettiset kantasolut c-Kit ja Sca-1 vasta-aineilla, mutta positiivista signaalia ei havaittu.

Tässä pro gradussa tehtyjen whole mount -värjäysten perusteella ei voida varmuudella sanoa, onko vastasyntyneen tai alkioikäisen hiiren kiveksessä hematopieettisia kantasoluja. Toisaalta hematopieettisten kantasolujen olemassaoloa ei voi värjäysten perusteella kokonaan poissulkeakaan.



## 4. TULOSTEN TARKASTELU

### *4.1 Kudoskohtaisten makrofagien alkuperä yhä epäselvä*

Käsitys kudoskohtaisten makrofagien alkuperästä on ollut aktiivisen keskustelun aiheena viime vuosikymmenen ajan. Aiemmin ajateltiin, että kaikki kudoskohtaiset makrofagit ovat peräisin monosyyteistä (van Furth ym. 1968), tai ainakin sikiökaudella kudokseen kehittyneet makrofagit korvautuisivat myöhemmin täysin luuydinperäisten monosyyttien tuottamalla makrofageilla. Osassa kudoksista, kuten ohutsuolessa ja sydämessä näin tapahtuukin (Bain ym. 2014; Molawi ym. 2014). Korvautumista ei kuitenkaan tapahdu kaikissa kudoksissa. Käsitys siitä, että makrofagit ovat lyhytikäisiä ja monosyyteistä jatkuvasti kehittyviä soluja on uusien tutkimustulosten myötä muuttunut. Kuduskohtaisten makrofagien on todettu olevan pitkäikäisiä soluja, jotka kykenevät itse uusiutumaan kudoksessa ilman, että luuytimen tuottamien monosyyttien olisi korvattava kudusmakrofageja jatkuvasti uusilla soluilla (Merad ym. 2002; Hashimoto ym. 2013). Viime vuosikymmenen aikana on huomattu, että suurin osa kudoskohtaisista makrofageista on peräisin jo sikiökaudelta, eikä luuydin välttämättä osallistu näiden kudoskohtaisten makrofagien ylläpitoon lainkaan (Ginhoux ym. 2016; Hoeffel ym. 2018).

Kudoskohtaisten makrofagien alkuperän selvittäminen on oleellista, sillä niillä on merkittävä vaikutus paitsi synnynnäisen immuunivasteen käynnistämisessä, mutta myös paikallisten kudusvaurioiden korjaamisessa, kudoksen kehityksessä ja kudoshomeostasian ylläpidossa. Erityisesti sikiökautiset makrofagit vaikuttavat elinten morfologisen kehityksen lisäksi kudosten tarkoituksenmukaiseen toimintaan. Tämä on havaittu esimerkiksi kiveksessä, jossa makrofagien puutos nimenomaan sikiökaudella aiheutti häiriöitä spermatogeneesissä eli siittiöiden tuotannossa myöhemmällä iällä, mutta makrofagien puutos syntymän jälkeen ei vaikuttanut spermatogeneesiin millään lailla (Lokka ym. 2020). Kuduskohtaisten makrofagien moninaisten tehtävien myötä on ilmeistä, että makrofagit ovat paljon heterogeenisempi ja vaikeammin määriteltävissä oleva solupopulaatio, kuin mitä nykyiset luokitukset antavat ymmärtää. Makrofagien todellisen alkuperän selvittämisessä riittää tutkittavaa vielä pitkään.

## 4.2 Hiiren kiveksen makrofagipopulaatiot

Hiiren kiveksessä on pitkään tiedetty olevan kaksi erilaista makrofagipopulaatiota. Nämä kudskohtaiset makrofagit tukevat kiveksen normaalia toimintaa, kuten hormonien tuotantoa ja spermatogeneesiä eli siittiöiden tuotantoa. Makrofagien jaottelusta ja etenkin niiden alkuperästä on ristiriitaisia tutkimustuloksia. CD206<sup>+</sup> -makrofagipopulaation alkuperästä ollaan jokseenkin yksimielisiä ja sen ajatellaan olevan peräisin sikiökaudelta. Enemmän epäselvyyttä on aiheuttanut kiveksen MHC II<sup>+</sup> -makrofagipopulaation alkuperä. Esimerkiksi Mossadegh-Kellerin tutkimusryhmän (2017) tulokset viittaavat siihen, että MHC II<sup>+</sup> -makrofagit ovat peräisin syntymänjälkeisistä, luuydinlähtöisistä progenitorisoluista. Toisaalta esimerkiksi Rantakarin ryhmä on selvittänyt kiveksen makrofagien alkuperää ja havainnut, ettei luuydintä tarvita toisen makrofagipopulaation muodostumiseen. Tutkimusryhmän havainnot osoittavat, etteivät makrofagit ole peräisin tunnetuista sikiöperäisistä lähteistä kuten ruskuaispussista tai sikiön maksasta (Lokka ym. 2020). Vaikuttaisi siis siltä, että kahden tunnetun sikiökautisen makrofagilähteen (eli ruskuaispussin ja sikiön maksan) lisäksi olisi olemassa jokin kolmas sikiöaikainen lähde, joka tuottaa pysyviä kudskohtaisia makrofageja. Ajatus aivan uudesta hematopoeettisesta lähteestä, joka tuottaa kudskohtaisia makrofageja, ei ole täysin mahdoton. Melko hiljattain on esimerkiksi havaittu uudenlainen kantasolupopulaatio ihmisen kiveksessä. Pitkään ajateltiin, että spermatogoniat (SSC, *engl.* spermatogonial stem cell) ovat primitiivisimpiä kantasoluja kiveksessä, mutta Bhartiya kumppaneineen (2010, 2013) havaitsivat, että kiveksessä on myös niin kutsuttuja VSEL-soluja (*engl.* very small embryonic-like stem cells), jotka ovat vielä varhaisempia kantasoluja kuin spermatogoniat. On ilmeistä, etteivät kiveksen kehitys ja kiveksessä ilmenevien kantasolupopulaatioiden alkuperä ole vielä täysin selvitetty. Voi olla, että tutkimuksissa pystytään karakterisoimaan hiiren kiveksen MHC II<sup>+</sup> -makrofagipopulaatiolle jokin uusi alkuperä.

### 4.2.1 Virtaussytometria

Tässä pro gradu -työssä selvitettiin, onko hiiren kiveksen MHC II<sup>+</sup> makrofagipopulaatio peräisin hematopoeettisista kantasoluista, jotka ovat jääneet kivekseen yksilönkehityksen aikana AGM-juosteesta. Virtaussytometria-analyyseissä hiiren kehittyvässä kiveksessä havaittiin muutamia hematopoeettisia kantasoluja, mikä tukee oletusta siitä, että mikäli hematopoeettisia kantasoluja kiveksessä on, niitä on siellä vain vähän. Tutkimuksen kannalta oli haasteellista saada virtaussytometria-analyysiä varten

riittävästi soluja. Jotta edes nämä muutamat hematopoeettiset kantasolut oli mahdollista havaita, tarvittiin suuri määrä kiveksiä jo lähtötilanteessa, sillä kudosten käsittelyssä ja vasta-ainevärjäyksissä menetettiin paljon soluja. Riittävän kivesmäärän saaminen alkioikäisiltä ja vastasyntyneiltä hiiriltä oli haastavaa, sillä ennalta ei voitu tietää kuinka monta urosta pentueessa oli.

Itse virtausytometriatekniikkaan liittyviä haasteita ovat ennen varsinaisia analyysejä tehtävä kompensatioasetusten määrittäminen ja analyysissä tehtävä solupopulaatioiden rajausta (*engl.* gating). Virtausytometrialaitteen mittaustiloihin vaikuttavilla kompensatioasetuksilla voidaan vähentää fluorokromien emittoiman valon aallonpituuksien päällekkäisyyksiä. Vaikkakin laitevalmistajat ohjeistavat kullekin laitteelle tehtävissä kompensatioasetuksissa (Biosciences 2020), tutkija voi melko vapaasti myös itse määrittää ne omien mieltymysten ja tulkinnan perusteella. Lisäksi, jos virtausytometrin asetuksia muutetaan eri koekertojen välillä (kuten laitehuollon yhteydessä), voi olla, että kompensatiot on tehtävä uudelleen, eikä niitä välttämättä saada täysin vastaamaan aiempien kokeiden vastaavia kompensatioita, jolloin virheellisten tulkintojen riski lisääntyy. Myös analyysivaiheessa tehtävä solupopulaatioiden rajausta on melko lailla riippuvainen tutkijan omista päätöksistä rajata populaatiot tietyllä tavalla, mikä voi heikentää tulosten luotettavuutta. Virtausytometria-analyyseissä tarkastelun kohteeksi voidaan valita hyvin moninaiset solupopulaatiot. Pro gradu -tutkimuksen tavoitteena oli havaita erityisesti sikiöaikaisia hematopoeettisia kantasoluja, joten tarkastelun kohteeksi valittiin CD45<sup>-</sup>-proteiinin suhteen negatiiviset (CD45<sup>-</sup>) solut. Tämä siksi, että vaikkakin CD45<sup>+</sup>-solut katsotaan kuuluvan hematopoeettisten kantasolujen joukkoon, varhaisimmat hematopoeettiset kantasolut ovat CD45<sup>-</sup>-soluja.

Myös tässä työssä vain kerran tehty E16,5-ikäisten alkioiden virtausytometria-analyysi tulisi toistaa muutamia kertoja, jotta tuloksia voisi luotettavasti verrata E14,5 alkioiden ja vastasyntyneiden virtausytometrituloksiin. Oletettavaa on, että varhaisemmassa kehitysvaiheessa (E14,5 ja E16,5) hiiren kiveksessä on enemmän hematopoeettisia kantasoluja kuin myöhemmässä kehitysvaiheessa (vastasyntynyt), kuten tämän työn virtausytometria-analyyseiden perusteella näyttäisi olevan.

#### 4.2.2 Pesäkkeenkasvatuskokeet

Vastasyntyneiden hiirten kiveksistä tehdyt pesäkkeenkasvatuskokeet osoittivat, että hiiren kehittyvässä kiveksessä on toiminnallisia hematopoeettisia kantasoluja tai ainakin

niiden progenitorisoluja, jotka kykenevät proliferoimaan ja muodostamaan solupesäkkeitä. Maksamaljoilla kasvoi aina huomattavasti enemmän pesäkkeitä kuin maljoilla, joille oli laitettu kasvamaan kiveksistä eristettyjä soluja. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että kivesnäytteistä laitettiin pesäkekokeen alussa vähemmän soluja kasvamaan maljalle kuin maksanäytteistä. Viljelmässä kasvatettujen pesäkkeiden lukumäärä ja pesäkkeiden fenotyyppi riippuvat sekä käytetystä kudoksesta että käytetystä kasvatusalustasta. Geelimatriksin valmistajan ohjeessa kuvataan, minkä värisiä, kokoisia ja muotoisia pesäkkeitä eri progenitorisolutyypeistä todennäköisesti kasvaa ko. matriksissa. Geelimatriksin kompositio on sellainen, että se tarjoaa optimaalisen kasvatusalustan aikuisen hiiren luuytimen, pernan ja veren sekä sikiön maksan hematopoieettisille kantasoluille tai progenitorisoluille. Tässä työssä kiveksen soluista kasvaneiden pesäkkeiden morfologia vaihteli huomattavasti. Yleensä pesäkkeet olivat vaaleita ja pieniä verrattuna maksasolujen muodostamiin suuriin ja punertaviin pesäkkeisiin. Pesäkkeiden morfologian perusteella ei voida tehdä tarkkoja päätelmiä siitä, mitkä kantasolut tai progenitorisolut tarkalleen ovat kivesmaljoilla kasvaneet. Alustavat pesäkekokeet tarjoavat kuitenkin hyvän lähtökohdan jatkotutkimuksille. Jatkokokeissa maljan pinnalle kasvaneet pesäkkeet tulisi karakterisoida tarkemmin esimerkiksi värjäämällä pesäkkeiden solut spesifisillä kantasolumarkkeereilla. Näin voitaisiin vielä tarkemmin analysoida sitä, minkälaisia soluja maljalla kasvaa ja kuinka erilaistuneita kiveksen progenitorisolut ovat.

Pesäkekasvatuskoe tehtiin kerran E14,5-ikäisten alkioiden kudoksilla. Kivesmaljat olivat täynnä soluja 8 päivän inkubaation jälkeen. Kun maljoja tarkasteltiin 10 päivää kasvatuksen aloittamisesta, maljat olivat edelleen täynnä soluja, mutta solut näyttivät huonokuntoisilta, jopa kuolleilta. Voi olla, että E14,5-ikäisen alkion solut proliferoivat voimakkaammin tai sitten kantasolut proliferoivat normaalisti, mutta niitä oli jo alussa liian suuri määrä maljan tilavuuteen nähden. Tässä tilanteessa soluilta loppuivat sekä ravinteet että tila.

Kantasolukasvatukset kontaminoituvat helposti, joten pesäkkeiden annettiin muodostua 8-10 päivää ilman, että kasvatusmaljoja siirrettiin pois kasvatuskaapista. Ensinnäkin pesäkekoe tulisi toistaa E14,5-ikäisillä hiirillä, ja toiseksi, pesäkkeiden muodostumista tulisi tarkastella tiheämmin, ehkäpä jopa päivittäin. Koe olisi myös mielenkiintoista toistaa alle E14,5-ikäisillä hiirten alkioilla, mutta tämä voisi olla teknisesti liian haastava toteuttaa, sillä varhaisemmissa kehitysvaiheissa kivekset ja munasarjat muistuttavat hyvin paljon toisiaan ja alkion sukupuolta on lähes mahdotonta erottaa edes

mikroskooppisesti. Kiveksen sijaan pesäkekokeissa olisi mahdollista käyttää todella nuorten, alle E14,5 ikäisten alkoiden maksasta eristettyjä soluja.

#### 4.2.3 Immunohistokemialliset värjäykset

Tässä työssä tehdyt whole mount -värjäykset tukevat virtaussytometrialla ja pesäkekokeilla saatuja tuloksia. Kiveksistä havainnoitiin immunofluoresenssivärjäyksillä Sca-1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup> -soluja. Näitä proteiineja pidetään yleisesti hematopoieettisten kantasolujen markkereina. Tässä yhteydessä on kuitenkin todettava, että värjäysten laatu oli hyvin vaihteleva.

Sikiön maksasta voidaan havainnoida hematopoieettisia kantasoluja E11,5 – E12,5 alkaen aina lähes syntymään saakka (Chang ym. 2005). Syntymän jälkeen hematopoiesi tapahtuu luuytimessä. Alkion maksakudosta voidaan siten käyttää positiivisena kontrollikudoksena. Lisäksi hematopoiesi on maksassa todella aktiivista ja maksa on suhteellisen helppo preparoida alkioista. Positiivisina kontrollikudoksina käytettyjen maksan värjäykset eivät pro gradu -työssä kuitenkaan onnistuneet toivotulla tavalla. Immunohistokemiassa käytettiin muutamia vuosia aiemmin kerättyjä, heparinisoimattomia, pakastimessa säilytettyjä maksanäytteitä, mikä voi selittää negatiivisen värjäystuloksen. Maksasta päätettiin kerätä tuoreet näytteet, jotka käsiteltiin hepariinilla ja joista tehtiin uudet whole mount -näytteet. Maksan sinusoidirakenteen värjäys LYVE-1 vasta-aineella onnistui hyvin, mutta hematopoieettisia kantasoluja ei näistäkään näytteistä kyetty osoittamaan. Negatiiviset värjäystulokset viittaavat siihen, että Sca-1 vasta-aine ei toiminut tai että sen affiniteetti antigeeniin oli heikko. Tämä selittäisi heikon signaalin myös kiveksen whole mount -värjäyksissä.

Myöskään alkion AGM-rakenteita ei kyetty havainnoimaan immunohistokemiallisesti E10,5 alkioista. AGM-värjäyksissä käytetyt näytteet olivat muutaman vuoden vanhoja ja kenties tuoremmat alkionäytteet olisivat toimineet paremmin, mutta uusien alkoiden keräys ei ollut tämän pro gradu -työn puitteissa mahdollista. Voi myös olla, ettei tutkimuksessa käytetty Sca-1 vasta-aine ole paras mahdollinen vasta-aine havainnoimaan AGM-rakennetta. Hiiren alkion hematopoiesi tapahtuu AGM:ssä E10,5- E12,5, mutta Sca-1 vasta-aineen tunnistama antigeeni ilmentyy vasta E12 jälkeen (Golub ym. 2013). Voi siis olla, että E10,5 alkioissa ei vielä ilmentynyt antigeenia Sca-1 vasta-aineelle eikä spesifistä signaalia siksi havaittu. Toinen kantasolun havainnoiva, c-Kit markkeerin sitoutuva vasta-aine toimi vaihtelevasti eikä tulokset olleet kovinkaan johdonmukaisia. Kaiken kaikkiaan tässä tutkimuksessa immunohistokemiassa käytetyt vasta-aineet eivät

toimineet odotetulla tavalla, sillä edes kudoksista, joissa tiedetään olevan hematopoeettisia kantasoluja, positiivista värjäystulosta ei saatu.

Sca-1 vasta-ainetta ei ollut käytetty aikaisemmin tutkimusryhmässä eikä sen värjäysolosuhteita oltu lainkaan optimoitu. Vasta-aineen toiminnallisuus olisi pitänyt testata esimerkiksi värjäämällä aikuisen hiiren luuydin, joka varmuudella sisältää hematopoeettisia kantasoluja. Muita kudoksia, joissa tiedetään olevan Sca-1<sup>+</sup> soluja ovat muun muassa aikuisen hiiren perna ja veri sekä sikiön maksa. Hematopoeettisia kantasoluja on myös useissa ei-hematopoeettisissa kudoksissa, kuten luurankolihasessa ja sydänlihaksessa (Tanaka ym. 2015; Zhang ym. 2018).

Whole mount -värjäyksen tekeminen on perinteisiä parafiini- ja jääleikevärjäyksiä työläämpää ja aikaavievää. Yhdessä whole mount -värjäyskokeessa oli yleensä 2-4 erilaisella vasta-aineyhdistelmällä värjättyä kudospalaa negatiivisine värjäyskontroleineen. Koko värjäysprotokolla kudosten käsittelystä mikroskopointiin kestää lähes viikon. Mikroskopoinnin ja kuvaamisen jälkeen kuvat muokataan ja analysoidaan. Vasta analyysivaiheessa saadaan selville, ovatko vasta-aineet toimineet ja seuraavista työvaiheista, oli ne sitten värjäysparametrien optimointia tai kudosten prosessointivaiheen muokkaamista, voidaan päättää. Eli muutosten tekeminen värjäysprotokollaan ja näiden muutosten vaikutusten todentaminen on melko pitkä prosessi. Whole mount -värjäystekniikan käyttö tässä pro gradu -työssä oli kuitenkin perusteltua, sillä whole mount -tekniikalla saadaan värjättyä ja kuvattua kiveksestä huomattavasti suurempi palanen verrattuna parafiini- ja jääleikevärjäyksiin. Vastasyntyneen hiiren kives leikattiin usein kahteen tai kolmeen osaan, joista jokainen oli paksuudeltaan noin 300-500 µm. Sikiökautiset kivekset värjättiin ja kuvattiin kokonaisina. Koska oletuksena oli, että hematopoeettisia kantasoluja on vain vähän kiveksessä, ei perinteisten histologisten ohutleikkeiden (5-20 µm) tekeminen ollut perusteltua.

#### 4.2.4 Hiirten käyttö mallieläimenä on mielekästä mutta myös epävarmaa

Hiiren käyttäminen koe-eläimenä fysiologisissa tutkimuksissa on perusteltua, mutta myös vaivalloista, epävarmaa ja aikaa vievää. Tämä pro gradu -tutkimus alkoi hiirten parituksen suunnittelusta, sillä tarkoituksena oli saada kerättyä tietyn ikäisiä alkioita, joilta preparoitiin kudokset. Kaikilta parituksessa olleilta naarailta ei aina havaittu paritustulppaa, vaikka parittelu olisikin onnistunut. Tällöin alkoiden kudoksiakaan ei voitu kerätä, sillä tarkkaa hedelmöitymisajankohtaa eikä siten alkiopäivien

lukumäärääkään tiedetty. Toisinaan parittelutulppa havaittiin ja paritus purettiin, mutta myöhemmin todettiin, ettei naaras ollutkaan raskaana. Kudoksilla tehtäviä kokeita oli haastava suunnitella ja aikatauluttaa, sillä pentueen sukupuolijakaumaa ei voinut tietää etukäteen. Kaiken kaikkiaan alkioden keräämiseen liittyi useita epävarmuustekijöitä ja siihen kului paljon aikaa.

### *4.3 Yhteenveto*

Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään voisiko hiiren kiveksessä olla hematopoeettisia kantasoluja. Hypoteesinä oli, että mikäli hematopoeettisia kantasoluja löytyisi, ne voisivat toimia kiveksen toistaiseksi tuntemattomasta lähtöperästä olevan MHC II<sup>+</sup> -makrofagipopulaation tuottajana. Tutkimuksessa pyrittiin myös selvittämään mahdollisten hematopoeettisten kantasolujen lokaatiota kudoksessa. Tutkimuksen perusteella hiiren kehittyvässä kiveksessä on löydettävissä hematopoeettisia kantasoluja. Hematopoeettisten kantasolujen sijainnista kudoksessa ei voida tehdä tarkkoja päätelmiä, sillä whole mount -värjäykset eivät onnistuneet toivotulla tavalla.

Haastavaa tutkimuksessa oli se, että mikäli hematopoeettisia kantasoluja löytyisi, olisi niitä määrällisesti melko vähän, mikä voi johtaa tulkinnanvaraisuuteen tutkimustuloksia tarkasteltaessa. Tässäkin tutkimuksessa kaikilla käytetyillä metodeilla (pesäkkeenmuodostuskoe, virtausytometria-analyysi sekä whole mount -kudosvärjäys) havaittiin hematopoeettisia kantasoluja.

Virtausytometrinen analyysi perusteella hiiren kehittyvässä kiveksessä on löydettävissä hematopoeettisia kantasoluja. Varhaisemmissa kehitysvaiheissa kantasoluja löytyy enemmän kuin myöhemmissä kehitysvaiheissa. Joka tapauksessa hematopoeettisten kantasolujen määrä yhdessä kiveksessä on pieni. Pesäkkeenkasvatuskokeiden mukaan hiiren kehittyvä kives sisältää hematopoeettisia kantasoluja tai niiden progeniittorisoluja. Lisäksi pesäkkeenkasvatuskokeiden perusteella löydettyt solut ovat myös toiminnallisia, eli ne kykenevät sopivissa olosuhteissa proliferoimaan.

Immunofluoresenssivärjätyissä whole mount -näytteissä oli havaittavissa muutamia hematopoeettisia kantasoluja E14,5-ikäisen alkion kiveksessä, vaikka useimmat värjätyistä kiveksistä olivat negatiivisia hematopoeettisten kantasolujen vasta-aineväreille. Vanhemmalla alkiolla (E16,5) ja vastasyntyneellä ei ollut havaittavissa

hematopoieettisia kantasoluja kiveksessä. Myöskään kontrollivärjäykset (sikiön maksa ja AGM-rakenne) eivät toimineet.

Hiiren kiveksen kudospöhtaisten makrofagien alkuperä ei ole vielä kukaan täysin selvillä, mutta tässä pro gradu -työssä tehtyt tutkimukset osoittavat, että hiiren kehittyvässä kiveksessä on hematopoieettisia kantasoluja, joten on mahdollista, että MHC II<sup>+</sup> -makrofagit ovat näistä kantasoluista peräisin.



## KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajaani Dosentti Pia Rantakaria Turun Biotiedekeskukselta siitä, että hän antoi minulle mielenkiintoisen ja haastavan opinnäytetyöaiheen ja mahdollisti laadukkaat puitteet tämän tutkimuksen tekemiselle. Ilokseni saan jatkaa työtäni Pian innostavassa ohjauksessa myös tulevaisuudessa. Ohjaajaani Tiina Henttistä Turun yliopiston biologian laitokselta haluan kiittää laadukkaista ja kehittäivistä kommentteista, tsemppauksesta, sekä siitä tunteesta, että oppilaan työn laatu merkitsee ja että sen hiomiseen kannattaa nähdä vaivaa. Lähiohjaajaani tohtoriopiskelija Emmi Lokkaa kiitän suuresti lähes kaikista tässä tutkimuksessa vaadittujen käytännön taitojen opettamisesta ja kärsivällisestä neuvomisesta. Tämän pro gradu työn aikana meidän molempien elämässä tapahtui suuria muutoksia ja olen iloinen siitä, että yhteistyön myötä sain hänestä myös läheisen ystävän. Kiitän myös muita tutkimusryhmämme jäseniä lämpimästi työilmapiiristä ja auttamisen kulttuurista työyhteisössämme.

Kiitän myös ystäviäni ja etenkin opiskelijakollegaani Katri Heikkilää, joka oli vertaistuki vailla vertaa läpi koko prosessin. Haluan kiittää myös perhettäni ja etenkin puolisoani Markusta, joka mahdollisti minulle joustavat kirjoitusajat hoitaen puolestani kodin ja perheen.

## LÄHTEET

Atlas of plant and animal histology. 2020. Male reproductive system. Haettu 16.8.2020. [https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/2-organos-a/guiada\\_o\\_a\\_07re-masculino.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/2-organos-a/guiada_o_a_07re-masculino.php)

Biosciences. 2020. Procedure for Manual Setting of Compensation for Multi-Color Flow Cytometric Analysis. Haettu 3.9.2020. <https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/setting-compensation-multicolor-flow>

Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. 2018. Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Bain C, 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.

Baron MH, Isern J, Fraser ST. 2012. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 21, 4828-4837.

Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Unni SK, Pethe P, Dhabalia JV, Patwardhan S, Tongaonkar HB. 2010. Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 58, 1093–1106.

Bhartiya D, Unni S, Parte S, Anand S. 2013. Very small embryonic-like stem cells: Implications in reproductive biology. *BioMed Research International* 12, 1093-1106.

Chang KT, Šefc L, Pšenák O, Vokurka M, Nečas E. 2005. Early fetal liver readily repopulates B lymphopoiesis in adult bone marrow. *Stem Cells* 23, 230–239.

DeFalco T, Bhattacharya I, Williams AV, Sams DM, Capel B. 2014. Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E2384–E2393.

DeFalco T, Potter SJ, Williams AV, Waller B, Kan MJ, Capel B. 2015. Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Reports* 12(7), 1107–1119.

- Dieterlen-Lievre F. 1975. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *Development* 33, 607–619.
- Durairajanayagam D. 2018. Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology* 16, 10–20.
- Dzierzak E, Speck NA. 2008. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunology* 9, 129–136.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116(5), 829–840.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 5966, 656-661.
- Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, D’Ambrosi N. 2017. The dual role of microglia in ALS: mechanisms and therapeutic approaches. *Frontiers in Aging Neuroscience* 9.
- Ginhoux F, Guilliams M. 2016. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity* 3, 439-449.
- 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, De Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR. 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- 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, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
- Hedger MP. 2002. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *Journal of Reproductive Immunology* 57, 19–34.

- Hill Richard W, Gordon A. Wyse, ja Margaret Anderson. 2012. *Animal Physiology* . s. 487, 3. painos, Sunderland (Mass.)
- Hoeffel G, Ginhoux F. 2015. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Frontiers in Immunology* 6.
- Hoeffel G, Ginhoux F. 2018. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cellular Immunology* 330, 5–15.
- Hume DA, Halpintt D, Charlton H, Gordon S. 1984. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs (pituitary/adrenal cortex/corpus luteum/testis). *Trends in Immunology* 2, 98-112.
- 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.
- Jokela H, Lokka E, Kiviranta M, Tyystjärvi S, Gerke H, Elima K, Salmi M, Rantakari P. 2020. Fetal-derived macrophages persist and sequentially mature in ovaries after birth in mice. *Eur. J. Immunol.* 2020 00, 1–15.
- Jones CV, Ricardo SD. 2013. Macrophages and CSF-1: implications for development and beyond. *Organogenesis* 9, 249-260.
- Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. 2014. Sertoli cells - immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. 2007. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia* 39, 45–50.
- 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* 2020 11:1., 11, 1–16.
- McCulloch EA, Till JE. 1960. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiation Research* 13, 115-125.

- Meinhardt A, Hedger MP. 2011. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and Cellular Endocrinology* 335, 60–68.
- Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology* 3, 1135–1141.
- Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, Pinto AR, Klapproth K, Henri S, Malissen B, Rodewald HR, Rosenthal NA, Bajenoff M, Prinz M, Jung S, Sieweke MH. 2014. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *Journal of Experimental Medicine* 211, 2151–2158.
- Mossadegh-Keller N, Gentek R, Gimenez G, Bigot S, Mailfert S, Sieweke MH. 2017. Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 2829–2841.
- Niemi M, Sharpe RM, Brown WRA. 1986. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell and Tissue Research* 243, 337–344.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. 1991. Development of hematopoietic progenitors. *Development* 126, 5073–5084.
- Punt J ym. 2020. *Kuby Immunology*, s. 32, 41, 8. painos, New York: W.H. Freeman.
- Rock B, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 942–964.
- Salmi M. 2017. Makrofagit ja syöpä. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 133(9), 829-37.
- Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, Lippens S, Abels C, Schoonooghe S, Raes G, Devoogdt N, Lambrecht BN, Beschin A, Guilliams M. 2016. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature Communications* 7.
- Stremmel C, Schuchert R, Wagner F, Thaler R, Weinberger T, Pick R, Mass E, Ishikawa-Ankerhold HC, Margraf A, Hutter S, Vagnozzi R, Klapproth S, Frampton J, Yona S, Scheiermann C, Molkenin JD, Jeschke U, Moser M, Sperandio M ym. 2018. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nature Communications* 9, 1–14.

- Tanaka Y, Inoue-Yokoo T, Kulkeaw K, Yanagi-Mizuochi C, Shirasawa S, Nakanishi Y, Sugiyama D. 2015. Embryonic hematopoietic progenitor cells reside in muscle before bone marrow hematopoiesis. *Plos One* 10.
- van Furth R, Cohn ZA. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 128, 415–435.
- Wolpert L (Lewis), Cheryll Tickle, ja Alfonso Martinez Arias. 2016. *Principles of Development*, s. 328, 5. painos, Oxford: Oxford University Press.
- Wu L. 2010. A Flt3L encounter: mTOR signaling in dendritic cells. *Immunity* 33, 580-582.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455.
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conion RA, Breitman ML, Rossant J. 1999. Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489–498.
- Zhao Y, Zou W, Du J, Zhao Y. 2018. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *Journal of Cellular Physiology* 233, 6425-6439.

## LIITE

Liuokset:

### **EPICS PBS**

Kaupallinen PBS tabletti (Gibco, tuotenumero 18912-014).

Valmistetaan valmistajan ohjeen mukaan (1 tabletti liuotetaan 500 ml:aan MilliQ-vettä).

Ei steriloida, säilytys +4 °C:ssa.

### **EPICS PBS I**

40 ml EPICS PBS

0,8 ml FCS (tai FBS)

0,04 ml 4 % NaN<sub>3</sub>

### **EPICS FIX**

20 ml EPICS PBS

0,54 ml 37 % formaldehydi