

# **Aivolisäkkeen makrofagien osallisuus gonadotrofin toimintaan**

Molekyylibiotieteiden

pro gradu -tutkielma

Laatija:

Lauriina Tola

30.3.2025

Turku

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

Pro gradu –tutkielma

**Oppiaine:** Molekyylibiotieteet, solubiologian linja

**Tekijä:** Lauriina Tola

**Otsikko:** Aivolisäkkeen makrofagien osallisuus gonadotrofin toimintaan

**Ohjaajat:** FM Henna Lehtonen, FT Heli Jokela

**Sivumäärä:** 72 sivua

**Päivämäärä:** 30.3.2025

Makrofagit ovat kudosspesifisiä synnynnäisen immunitetin soluja, joilla on immunologisten ominaisuuksiensa lisäksi kudosspesifisiä kudosta ylläpitäviä ominaisuuksia. Makrofagit voivat olla peräisin yhdestä verenmuodostuksen kolmesta aallosta.

Aivolisäke on kallonpohjassa sijaitseva umpieritysjärjestelmän elin, joka yhdessä hypotalamuksen kanssa ylläpitää ja säätelee kehon hormonitasapainoa. Gonadotrofit ovat gonadotropiineja, eli sukupuolirauhasia sääteleviä hormoneja, tuottavia aivolisäkkeen etulohkon hormonisoluja, joiden toimintaa säätelee hypotalamuksen tuottama ja erittämä gonadotropiineja vapauttava hormoni, GnRH (*engl.* gonadotropin releasing hormone). Joidenkin makrofagien tiedetään ilmentävän GnRH-reseptoria, mutta aivolisäkkeen makrofagien ei olla osoitettu ilmentävän sitä.

Kun makrofagien pääsy aivolisäkkeeseen evätään täysin injektoimalla hiiriin makrofageja depletoivaa vasta-ainetta alkiokehityksen päivänä E6.5, kaikkien etulohkon tuottamien hormonien eritysväheneminen, mutta erityisesti gonadotrofin tuottaman luteinisoivan hormonin. Tämän vuoksi valittiin juuri gonadotrofit tarkasteltaviksi hormonisoluiksi. Pääasiallisena tutkimuskysymyksenä olikin siis selvittää, miten aivolisäkkeen makrofagit vaikuttavat gonadotrofin toimintaan primäärikasvatuksissa.

Tutkimuksessa käytettiin useita menetelmiä, mukaan lukien virtaussytometriaa ja immunofluoresenssivärväjäyksiä. Päämenetelmänä oli solujen lajittelu ja ATP-tasojen mittaaminen primäärikasvatuksista. ATP-mittauksia tehtiin, sillä ATP:llä on merkittävä rooli gonadotrofin gonadotropiinihormonien erityksessä.

Tutkielman kokeellisessa osuudessa optimoitiin AF546-fluorokromikonjugoitu sekudäärivasta-aine GnRHR-primäärivasta-aineelle pariksi. Saatiin selville pienen populaation kaikista aivolisäkkeen makrofageista ilmentävän pinnallaan GnRH-reseptoria. Perusprotokolla ATP:n konsentraation mittaamiseksi gonadotrofin ja aivolisäkkeen makrofagien primäärikasvatuksista saatiin optimoitua. Lopuksi saatiin selville aivolisäkkeen makrofagien erittävän ATP:tä primäärikasvatuksissa ja GnRH-stimulaation seurauksena ATP:n määrä nousevan yhä. Aivolisäkkeen makrofagien ja gonadotrofin yhteisten primäärikasvatusten ATP-konsentraatioiden todettiin olevan keskimäärin yksittäiskasvatuksia alhaisempia.

Aivolisäkkeen makrofagit reagoivat hormonistimulaatioon ja ovat osallisia gonadotrofin hormonituotannon säätelemiseen.

**Avainsanat:** aivolisäke, makrofagi, gonadotrofi, ATP, hormonisolu, GnRH, luteinisoiva hormoni

Haluan kiittää ohjaajiani Henna Lehtosta ja Heli Jokelaa heidän tuestaan, rakentavista kommenteistaan ja kärsivällisyydestään. Pia Rantakaria haluan kiittää ryhmäänsä ottamisestani, mahdollisuudesta oppia tutkimuksen tekemistä hyvin käytännönläheisesti ja tutkimusaiheestani. Koko Pia Rantakaran tutkimusryhmää haluan kiittää erinomaisesta työilmapiiristä. Haluan kiittää edesmenneitä säveltäjiä Nikolai Rimski-Korsakovia Šéhérazade-kappaleestaan, J.S. Bachia ja Ludwig van Beethovenia, joiden musiikki toimi ensisijaisena ja pääasiallisena taustamusiikkini tätä tutkielmaa kirjoittaessani. Haluan kiittää Olli-vaariani hänen tuestaan. Lopuksi haluan kiittää vanhempiani, Antti ja Tuulianna Tolaa, heidän järkkymättömästä ja pyyteettömästä tuestaan, arvostan sitä sanoinkuvailemattoman paljon.

## Lyhenteet

ACTH	Kortikotropiini ( <i>engl.</i> adrenocorticotropic hormone)
AGM-HSC	Aorta-gonadi-mesonefroksen hematopoieettinen kantasolu ( <i>engl.</i> aorta-gonad-mesonephros hematopoietic stem cell)
BM-MO	Luuytimen monosyytti ( <i>engl.</i> bone marrow monocyte)
CRH	Kortikotropiinia vapauttava hormoni ( <i>engl.</i> corticotropin-releasing hormone)
E	Alkiokehityspäivä ( <i>engl.</i> embryonic day), esim. E6.5
FL-MO	Alkion maksan monosyytti ( <i>engl.</i> fetal liver monocyte)
FSC	Follikulostellaattisolut ( <i>engl.</i> folliculostellate cells)
FSH	Follikkeleja stimuloiva hormoni ( <i>engl.</i> follicle stimulating hormone), follitropiini
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini ( <i>engl.</i> green fluorescent protein)
GH	Kasvuhormoni ( <i>engl.</i> growth hormone)
GHRH	Kasvuhormonia vapauttava hormoni ( <i>engl.</i> growth hormone releasing hormone)
GnRH	Gonadotropiineja vapauttava hormoni ( <i>engl.</i> gonadotropin-releasing hormone)
GnRHR	Gonadotropiineja vapauttavan hormonin reseptori ( <i>engl.</i> gonadotropin-releasing hormone receptor)
HPA	Hypotalamus-aivolisäke-lisämunuais-akseli ( <i>engl.</i> hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis)
HPG	Hypotalamus-aivolisäke-gonadi-akseli ( <i>engl.</i> hypothalamus-pituitary-gonadal axis)
HPT	Hypotalamus-aivolisäke-kilpirauhanen-akseli ( <i>engl.</i> hypothalamus-pituitary-thyroid axis)
LH	Luteinisoiva hormoni ( <i>engl.</i> luteinizing hormone)
MAC pre.	Makrofagien esiastesolu ( <i>engl.</i> macrophage progenitor)
MSH	Melanosyyttejä stimuloiva hormoni ( <i>engl.</i> melanocyte stimulating hormone)
P	Syntymän jälkeinen päivä ( <i>engl.</i> postnatal day), esim. P14

pitMØ	Aivolisäkkeen makrofagit ( <i>engl.</i> pituitary macrophages)
POM1	Polyoksongstaatti 1 ( <i>engl.</i> polyoxotungstate 1)
PRH	Prolaktiinia vapauttava hormoni ( <i>engl.</i> prolactin-releasing hormone)
PRL	Prolaktiini, maitohormoni ( <i>engl.</i> prolactin)
TRH	Tyreotropiinia vapauttava hormoni ( <i>engl.</i> thyrotropin-releasing hormone)
TSH	Kilpirauhasta stimuloiva hormoni, tyreotropiini ( <i>engl.</i> thyroid stimulating hormone)
VGCC	Jänniteriippuvainen kalsiumkanava ( <i>engl.</i> voltage-gated calcium channel)
YS-HE-EMP	Ruskuaispussin hemogeenisen endoteelin varhainen myeloidiesiastesolu ( <i>engl.</i> yolk-sac hemogenic endothelium early-myeloid-progenitor)

# Sisällys

<b>1. Johdanto</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Immuunijärjestelmä ja makrofagit</b>	<b>8</b>
1.1.1. Makrofagien alkuperä ja hematopoieesin kolme aaltoa	10
1.1.2. Umpirauhasten makrofagit	12
<b>1.2. Aivolisäke</b>	<b>15</b>
1.2.1. Aivolisäkkeen rakenne, toiminta ja kehitys	15
1.2.2. Aivolisäkkeen makrofagit	17
<b>1.3. Gonadotrofit ja gonadotropiinit</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1. P2XR-, VGCC- ja IP<sub>3</sub>R-reseptorikanavat gonadotrofeissa</b>	<b>20</b>
1.3.2. GnRHR-signaali	22
<b>1.4. Tutkimuksen tavoitteet</b>	<b>24</b>
<b>2. Materiaalit ja menetelmät</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Hiiret</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Jäälleikevärjaukset</b>	<b>25</b>
2.2.1. Näytteiden kerääminen ja valmisteleminen	25
2.2.2. Leikkeiden värjääminen	25
<b>2.3. Kudosten käsitteleminen virtausytometriä varten</b>	<b>27</b>
2.3.1. Kudosten kerääminen ja käsitteleminen	27
2.3.2. Kudosten värjääminen	28
<b>2.4. Solujen fluoresenssiavusteinen lajittelu</b>	<b>29</b>
2.4.1. Solujen lajittelu	29
2.4.2. Solujen kasvattaminen	30
<b>2.5. ATP- ja GnRH -käsittelyt ja ATP-mittaukset</b>	<b>30</b>
2.5.1. ATP- ja GnRH-käsittelyt ja näytteiden kerääminen	30
2.5.2. ATP-mittaukset	30
<b>3. Tulokset</b>	<b>31</b>
<b>3.1. GnRHR-primäärivasta-aine toimii parhaiten AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa virtausytometriassa ja immunohistokemiallisissa värjauksissä</b>	<b>31</b>
3.1.1. GnRHR-primäärivasta-aine toimii AF488- ja AF546-fluorokromikonjugoitujen sekundäärivasta-aineiden kanssa immunohistokemiallisissa kudostenleikkeiden värjauksissä	31
3.1.2. GnRHR-primäärivasta-aine toimii AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa fenotyypittävissä virtausytometrisessä analyysissä	38

<b>3.2. Aivolisäkkeessä on GnRHR-positiivisten makrofagien alapopulaatio</b>	<b>39</b>
3.2.1. Aivolisäkkeen GnRHR-positiiviset pitMØ-solut ja gonadotrofit kyetään osoittamaan aivolisäkkeestä fenotyyppittävällä virtaussytometrisellä analyysillä	39
<b>3.3. Aivolisäkkeen makrofageja ja gonadotrofeja kyetään lajittelemaan virtaussytometrialla</b>	<b>42</b>
3.3.1. Analyysimallit virtaussytometrisille solulajittelijoille	42
3.3.2. SONY SH800 - ja BD S8 Discover -solulajittelijoilla pystytään lajittelemaan aivolisäkkeen gonadotrofeja ja pitMØ-soluja	44
<b>3.4. GnRH-indusointi saa aikaan muutoksia gonadotrofien ja pitMØ-solujen kasvatuksien ATP-konsentraatioissa</b>	<b>45</b>
3.4.1. ATP-tasojen mittaamisen protokollan optimointiprosessi	46
3.4.2. Yhteiskasvatuksissa pitMØ-solut reagoivat GnRH-stimulaatioon	48
<b>4. Tulosten tarkastelu</b>	<b>58</b>
<b>4.1. GnRHR-primäärivasta-aine toimii hiiren aivolisäkkeessä AF488- ja AF546- sekundäärivasta-aineiden kanssa</b>	<b>58</b>
<b>4.2. Hiiren aivolisäkkeessä on GnRHR-positiivinen makrofagien alapopulaatio</b>	<b>58</b>
<b>4.3. PitMØ-soluja ja gonadotrofeja voidaan lajitella fluorokromiavusteisesti solulajittelijoilla</b>	<b>59</b>
<b>4.4. PitMØ-solut reagoivat GnRH-stimulaatioon primäärikasvatuksissa</b>	<b>60</b>
<b>Yhteenveto</b>	<b>64</b>
<b>Kirjallisuus</b>	<b>65</b>
<b>Liitteet</b>	<b>72</b>
<b>Liite 1: Liuokset</b>	<b>72</b>

# 1. Johdanto

## 1.1. Immuunijärjestelmä ja makrofagit

Immuunijärjestelmä suojaa ja puolustaa kehoa taudinaiheuttajilta eli patogeeneiltä ja voidaan jakaa synnynnäiseen ja hankittuun immuniteettiin. Synnynnäinen immuniteetti kehittyy jo alkiokehityksen aikana ja on siten valmis puolustamaan elimistöä patogeeneiltä heti yksilön synntyä. Hankittu immuniteetti taas kehittyy yksilön syntymän jälkeen ja vaatii patogeenien aiheuttamia infektioita kehittyäkseen.

Kaikkia hankittuun ja synnynnäiseen immuniteettiin kuuluvia soluja kutsutaan valkosoluiksi eli leukosyyteiksi. Synnynnäiseen immuniteettiin kuuluvia leukosyyttejä ovat myeloidisen linjan solut: monosyytit, neutrofiilit, dendriittisolut ja makrofagit. Hankitun immuniteetin soluja ovat lymfoidisen linjan solut eli lymfosyytit: B- ja T-solut, dendriittisolut ja syöttösolut eli NK-solut (*engl.* natural killer cells, NK-cells).

Immuunisolujen lisäksi immuniteettiin luetaan kuuluvaksi myös ns. komplementtijärjestelmä (*engl.* complement system), joka koostuu noin 40:stä liukoisesta proteiinista, jotka toimivat kaskadina. Näitä komplementtiproteiineja tuottavat maksan lisäksi hankitun immuniteetin solut. Komplementtijärjestelmän tarkoituksena on havaita, merkitä ja auttaa leukosyyttejä tuhoamaan taudinaiheuttajia.

Viime vuosina tehdyn tutkimuksen myötä on huomattu synnynnäisen ja hankitun immuniteetin välisen rajan olevan aiempaa luultua utuisempi. Tutkimuksissa on löydetty ns. synnynnäisiä lymfosyyttejä (*engl.* innate lymphoid cells), joilla on kudoksia ylläpitäviä ominaisuuksia (Vivier ja muut 2018). Monista kehon kudoksista on tutkimuksissa löydetty kudosllymfosyyttejä (*engl.* tissue-resident lymphocytes), joilla on veren mukana kiertävistä lymfosyyteistä eroavia fenotyyppisiä (Fan ja Rudensky 2016; Sun ja muut 2019).

Makrofagit ovat Ilja Metšnikovin löytämä synnynnäisen immuniteetin solutyyppi, joita esiintyy kehon kaikissa kudoksissa, joissa niitä kutsutaankin kudosspesifisiksi makrofageiksi (Blériot ja muut 2020; Gordon 2008; Mechnikov 1988). Näillä ns. kudostmakrofageilla on immunologisten ominaisuuksiensa, kuten fagosytoosin eli solusyönnin ja antigeenien esittelyn, lisäksi muita kohdekudostaan ylläpitäviä ja sen kehityksen kannalta kriittisiä tehtäviä. (Zhang ja muut 2021.) Näin ollen makrofagit ovatkin usein kudoksen suurin immuunisolupopulaatio.

Fenotyyppinsä perusteella makrofageja voidaan jakaa eri kategorioihin. Perinteisesti makrofageja on luokiteltu M1/M2-dikotomian mukaan joko klassisesti aktivoituiksi ja tulehdusta edistäviksi eli

proinflammatorisiksi makrofageiksi (M1-tyyppi) tai vaihtoehtoisesti aktivoituiksi ja tulehdusta alentaviksi eli anti-inflammatorisiksi makrofageiksi (M2-tyyppi). Esimerkiksi CD206-reseptoria ilmentävät tyypillisesti M2-makrofagit, kun taas M1-makrofagit tyypillisesti ilmentävät pinnallaan CD86-reseptoria. Nykyisin kuitenkin tiedetään, että M1/M2-malli on osittain toimiva vain in vitro -olosuhteissa eikä edusta in vivo -olosuhteita todenmukaisesti. Makrofagit, kuten solut yleisestikin, ovat plastisia ja niiden ominaisuudet ja toiminta ovat riippuvaisia muun muassa myös niiden kudospäristöstä ja alkuperästä. Taulukossa 1 on listattuna keskeisimpiä leukosyyttimarkkereita, jotka mainitaan tässä tutkielmassa.

Taulukko 1. Tässä tutkielmassa mainitut keskeisimmät leukosyyttimarkkerit ja niitä ilmentävät solut.

Markkeri	Tehtävä
CD45	Hematopoieettisten solujen markkeri, leukosyyttimarkkeri
Ly6C	Luuytimen monosyyttien markkeri
CD11b	Myeloidisten linjan solujen markkeri
F4/80	Makrofagien ja muiden synnynnäisen immunitetin solujen markkeri
MHC II	Antigeeniä esittelevä kompleksi II; makrofagien, dendriittisolujen, monosyyttien ja B-solujen markkeri
CX3CR1	Hematopoieettiset solut, ruskuaispussiperäiset makrofagit, monosyytit
CCR2	Monosyytit ja monosyyttiperäiset makrofagit
CD206	Mannoosireseptori; makrofagit, perivaskulaariset makrofagit

Jokaisen kudoksen kudosspesifinen makrofagipopulaatio on kudokselleen uniikki ja tukee siten kudoksen kehitystä ja ylläpitää sen toimintaa. Esimerkiksi maksan kudismakrofagit, Kupfferin solut, osallistuvat raudan ja kolesterolin kierrättämiseen (Scott ja Guilliams 2018), keuhkojen alveolaariset makrofagit poistavat keuhkorakkuloista pintajännitettä säätelevää ainetta (Bain ja MacDonald 2022), ja aivojen mikroglia-solut osallistuvat hermokudoksen kehitykseen karsimalla ylimääräisiä synapseja (Paolicelli ja muut 2011).

Makrofageja, niiden toimintaa ja vaikutusta kudokseensa voidaan tutkia niin in vivo - kuin in vitro -tekniikoilla. In vivo -tekniikat hyödyntävät enimmäkseen koe-eläimiä, kuten hiiriä. On olemassa useita makrofagien tutkimiseen valmistettuja hiirilinjoja, jotka esimerkiksi Cre-lox -tekniikan ansiosta pystyvät konditionaalisesti ilmentämään haluttua proteiinia. Tällainen hiirilinja on esimerkiksi Cx3cr1-GFP, joka ilmentää vihreää fluoresoivaa proteiinia (*engl.* green fluorescent

protein, GFP) Cx3cr1-markkeria ilmentävissä soluissa (Jung ja muut 2000). In vitro -tekniikoissa hyödynnetään usein solulinjoja ja kudoksista eristettyjä soluja, joita kasvatetaan soluviljelmissä, eli primääriviljelmissä. In vivo -tekniikoita käytettäessä voidaan saada kokonaisvaltaisempi käsitys tutkittavasta kudoksesta tai solutyypistä, sillä kaikki kehon solut ja kudokset pystyvät kokeen aikana olemaan vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. In vitro -tekniikoita käytettäessä pystytään tarkastelemaan solujen välistä kanssakäymistä ilman in vivo -viitekehystä, mikä on myös in vitro -tekniikoiden heikkous.

### 1.1.1. Makrofagien alkuperä ja hematopoieesin kolme aaltoa

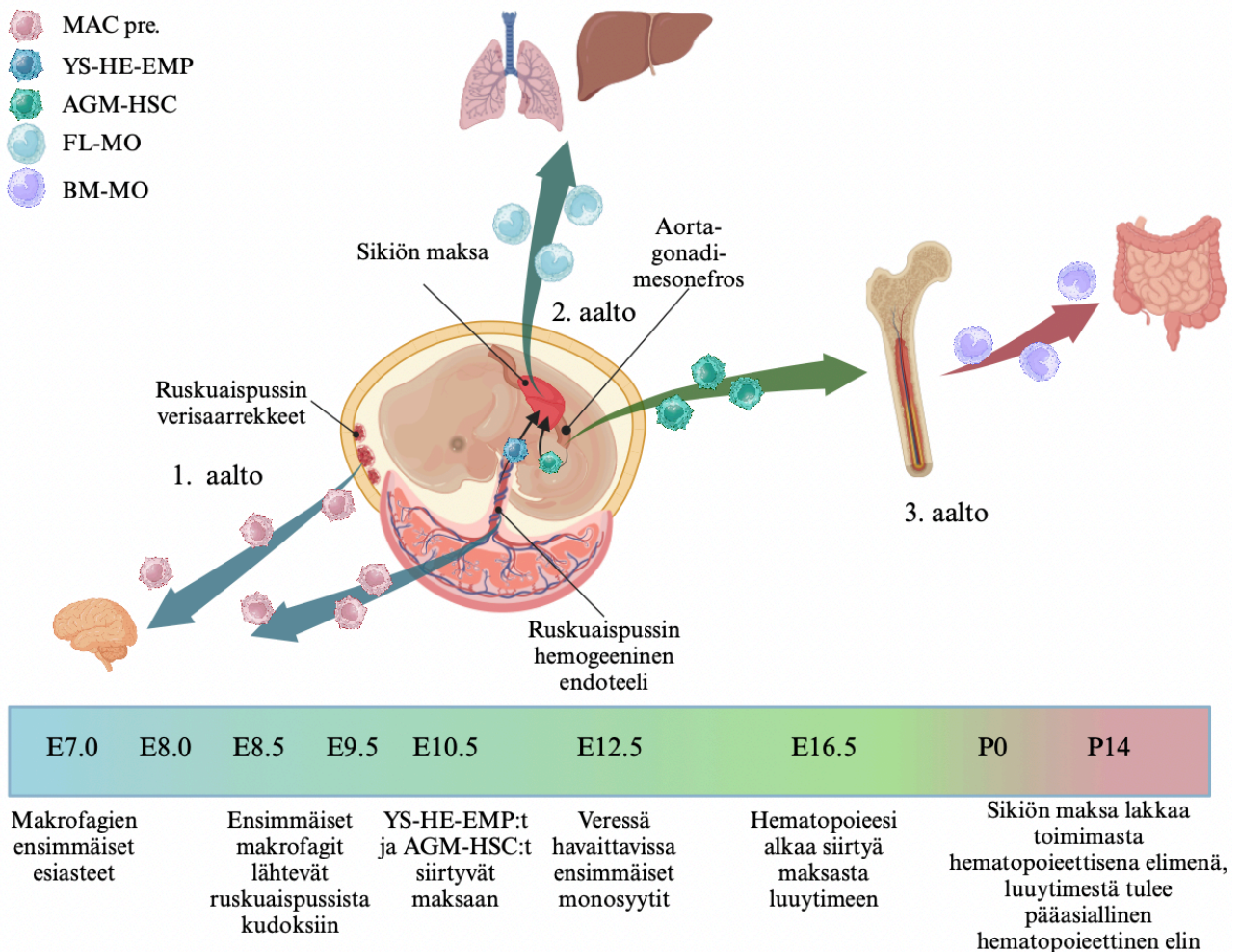
Makrofagit voivat olla peräisin kolmesta kudoksesta: ruskuaispussista, alkion maksasta tai luuytimestä (Hoeffel ja Ginhoux 2015, 2018). Nämä kolme kudosta edustavat verenmuodostuksen eli hematopoieesin kolmea aaltoa, jotka tapahtuvat erillään toisistaan ajallisesti ja paikallisesti (kuva 1). Ruskuaispussi on alkion ulkopuolinen rakenne, joka ympäröi alkiota. Se toimii hematopoieesin syntypaikkana ja ennen istukan muodostumista suorittaa tyypillisiä istukan tehtäviä, kuten ravinteiden kuljetuksen alkioon.

Kudosten makrofageista suurin osa on peräisin kahdesta ensimmäisestä aallosta (kuva 1.) (Rehman ja muut 2021). Ruskuaispussista peräisin olevat makrofagit eivät koskaan käy läpi monosyyttivaihetta ja asettuvat asuttamaan kudoksia kehityksen aikana ensimmäisinä. Alkion maksasta ja luuytimestä peräisin olevat makrofagit käyvät ensin läpi monosyyttivaiheen, jonka jälkeen ne erilaistuvat makrofageiksi vasta kohdekudokseensa päästyään.

Hiiren alkiokehitys kestää 19–21 päivää, ja hematopoieesia tapahtuu noin kaksi kolmasosaa sen kestosta. Varhainen hematopoieesi (engl. primitive hematopoiesis) alkaa alkion ruskuaispussin verisaarekkeissa (engl. blood islands), alkion kehityksen ajankohtana E7.0 – 7.5. Makrofagien ensimmäiset esiasteet (*MAC pre.*, kuva 1) muodostuvat ruskuaispussin verisaarekkeissa, joissa ne odottavat verisuoniston muodostumista noin E8.0 saakka (Munro ja Hughes 2017). Verisuoniston muodostuttua nämä esiasteet vaeltavat kohdekudoksiinsa (kuva 1, 1. aalto), kuten aivoihin (Palis ja Yoder 2001). Ensimmäisen aallon makrofagit ovat siis kudosten ensimmäisiä makrofageja. (Ginhoux ja Guilliams 2016; Hoeffel ja Ginhoux 2018.)

Tilapäinen hematopoieesi (engl. transient definitive hematopoiesis) tapahtuu myös alkioaikana ja sijoittuu alkion maksaan. Alkion kehityksen ajankohtana E10.0–10.5 ruskuaispussin hemogeenisen endoteelin myeloidisen linjan kantasolut (YS-HE-EMP, kuva 1; *yolk sac-hemogenic endothelium-early myeloid progenitors*) siirtyvät verenkierron mukana alkion maksaan (kuva 1., 2. aalto), josta tulee pääasiainen hematopoieettinen elin noin kehityksen ajankohtana E11.5 – 12.5 (Hoeffel ja

Ginhoux 2018; Palis ja Yoder 2001). Samoihin aikoihin myös aorta-gonadi-mesonefrosalueen hematopoieettiset kantasolut (AGM-HSC, kuva 1; *aorta-gonadal-mesonephros-hematopoietic stem cells*) siirtyvät alkion maksaan odottamaan siirtymistään luuytimeen. Tämän jälkeen alkion maksan monosyyttejä (FL-MO, kuva 1, *fetal liver-monocytes*) on havaittavissa veressä, jonka mukana monosyytit siirtyvät kohdekudoksiinsa erilaistumaan makrofageiksi. Alkion maksan tehtävä pääasiallisena hematopoieettisena elimenä alkaa hiipua kehityksen ajankohdasta E16.5 alkaen, jolloin hematopoieesi alkaa siirtyä luuytimeen lopulliseksi hematopoieesiksi (engl. definitive hematopoiesis). Hematopoieesin siirtyminen alkion maksasta luuytimeen on suhteellisen hidas prosessi ja vasta noin kahden viikon iässä se on siirtynyt kokonaan luuytimen tehtäväksi yksilön elämän loppuun saakka (kuva 1., 3. aalto). (Ginhoux ja Guilliams 2016; Hoeffel ja Ginhoux 2015, 2018.)



**Kuva 1. Verenmuodostuksen kolme aaltoa hiiressä sekä niiden ajallinen ja paikallinen sijoittuminen alkion kehityksen eri vaiheisiin.** E7.0 ensimmäiset makrofagien esiasteet muodostuvat ruskuaispussin verisaarrekkeissa, joista ne lähtevät vaeltamaan kudoksiin noin E8.0–8.5 vastamuodostuvan verisuoniston kautta. Noin E8.5 ruskuaispussin hemogeeninen endoteeli muodostaa aikaisia myeloidisia esiasteita, jotka noin E10.5 siirtyvät alkion maksaan. Aorta-gonadi-mesonefrosen muodostamat hematopoieettiset kantasolut siirtyvät noin E11.5–12.5 alkion maksaan odottamaan hematopoieesin siirtymistä luuytimeen. Alkion maksasta tulee noin E11.5 pääasiallinen hematopoieettinen elin ja noin E12.5 ensimmäiset alkion

maksan monosyytit ovat havaittavissa veressä. Ajankohdasta E16.5 lähtien hematopoieesi alkaa siirtyä alkion maksasta luuytimeen siten, että AGM-HSC:t siirtyvät luuytimeen, joka toimii pääasiallisena hematopoieettisena elimenä läpi yksilön loppuelämän. BM-MO, luuytimen monosyytit; FL-MO, alkion maksan monosyytit; MAC pre, makrofagien esiasteet; AGM-HSC, aorta-gonadi-mesonefroksen hematopoieettiset kantasolut; YS-HE-EMP, ruskuaispussin hemogeenisen endoteelin tuottamat varhaiset myeloidiset esiasteet. Kuva on tehty BioRender-ohjelmalla.

Eri alkuperistä olevilla kudismakrofageilla on kudoksissaan usein erilaisia tehtäviä. Alkioperäiset makrofagit ovat yleensä vastuussa kudoksen ylläpitämisestä ja sen toiminnan tukemisesta, kun taas veren monosyyteistä peräisin olevat makrofagit ovat usein tarpeellisia tulehduksen tai vaurion sattuessa. Alkioperäiset makrofagit ovat usein myös pitkäikäisempiä kuin veren monosyyteistä peräisin olevat makrofagit, jotka poistuvat kudoksesta tulehduksen hellitettyä. Toisaalta, osassa kudoksia ei ole juuri lainkaan alkioperäisiä makrofageja, vaan kudismakrofagien populaatio uudistuu jatkuvasti verestä värvätyillä monosyyteillä, jolloin myös verestä peräisin olevat makrofagit suorittavat kudosspesifisiä toimintoja. (Ginhoux ja Guilliams 2016; Jenkins ja Allen 2021.) Kudismakrofagien populaatioiden alkuperällinen koostumus onkin heterogeenistä siten, että eri alkuperistä olevia makrofageja on kullekin kudokselle uniikissa suhteessa.

### 1.1.2. Umpirauhasten makrofagit

Kehossa on useita umpirauhasia, jotka tuottamallaan hormoneillaan säätelevät kehon toimintaa. Umpirauhasia ovat muun muassa munasarjat, kivekset, lisäkivekset ja kilpirauhanen. Näin ollen umpirauhasten makrofageilla on tärkeä tehtävä näiden kudosten toiminnan ylläpitämisessä ja tukemisessa. Esimerkiksi umpirauhasten makrofagit edesauttavat hormonituotantoa, mutta hormonit vaikuttavat vastavuoroisesti myös niiden toimintaan.

Monet umpirauhasten makrofagit ovat peräisin alkioajalta, ruskuaispussista ja alkion maksan monosyyteistä. Haiman Langerhansin saarekkeiden, kivesten, kilpirauhasen ja lisämunuaisten makrofagipopulaatiot ovat suurimmaksi osaksi peräisin alkioajalta (Dolfi ja muut 2022; Ginhoux ja Guilliams 2016; Lokka ja muut 2020; Rehman ja muut 2021; Schulz ja muut 2012). Sen sijaan valkoisen rasvakudoksen ja munasarjojen makrofagipopulaatiot ovat tasapuolisemmin peräisin sekä alkioajalta että luuytimeestä (Félix ja muut 2021; Jokela ja muut 2020).

Kudismakrofagit eivät ole fenotyypiltään, sijoittumiseltaan kudokseen ja ominaisuuksiltaan homogeenisiä, ja näin on myös umpirauhasissa. Haiman Langerhansin saarekkeissa, eli haimasaarekkeissa, makrofageja on kahta päätyyppiä: saarekkeiden sisällä ja ulkopuolella olevia makrofageja. Nämä makrofagit ovat pääosin peräisin ruskuaispussista, vaikka pieni veren monosyyteistä peräisin oleva populaatio kudoksesta löytyykin. (Schulz ja muut 2012; Rehman ja muut 2021.) Saarekkeiden sisäiset makrofagit ilmentävät voimakkaasti CD11c-markkeria ja ovat tärkeässä osassa saarekkeiden morfogeneesissä eli muotoutumisessa. Saarekkeiden ulkopuolella

olevat makrofagit eli perisaarekemakrofagit eivät ilmennä CD11c-markkera. (Rehman ja muut 2021.) Lisämunuaisten makrofagit taas voidaan jakaa neljään alapopulaatioon ja niitä sijaitsee pääosin lisämunuaisten kuorikerroksessa (Dolfi ja muut 2022; Rehman ja muut 2021).

Lisämunuaisten kuorikerroksessa sijaitsevat makrofagit kietoutuvat hormonisolujen ympärille ja lisämunuaisten ytimessä sijaitsevat makrofagit sijoittuvat katekoliamiineja tuottavien Kromaffin solujen lähelle (Bijnen ja Bajénoff 2021; Rehman ja muut 2021). Niin valkoisesta kuin ruskeastakin rasvakudoksesta on myös löydetty makrofageja (Félix ja muut 2021; Rehman 2021). Kiveksissä on kaksi päämakrofagipopulaatiota, peritubulaariset ja interstitiaaliset makrofagit, eli siementiehyeen ulkopuolella sijaitsevat ja siementiehyeen välitilassa sijaitsevat makrofagit (Meinhardt ja muut 2022). Munasarjoissa sen sijaan on kolme makrofagipopulaatiota, jotka eivät sijoitu kudokseen populaatiospesifisesti (Jokela ja muut 2020).

Osan umpirauhasten makrofageista on todettu vaikuttavan tai säätelevän umpirauhasensa hormonituotantoon. Esimerkiksi, haiman Langerhansin saarekkeiden makrofagien ajatellaan olevan tärkeässä osassa muun muassa glukosistimuloidussa insuliinin erityksessä (Rehman ja muut 2021). Lisämunuaisten makrofagit taas säätelevät lisämunuaisten tuottaman aldosteroni-hormonin tuotantoa sekä vaikuttavat lisämunuaisten lipidimetaboliaan (Dolfi ja muut 2022). Kiveksissä makrofageja tarvitaan testosteronin tuotantoon Leydigin soluissa (Gaytan ja muut 1994; Hutson 2006; Nes ja muut 2000).

Umpirauhasten hormonit sekä erilaiset kehityksen kynnysvaiheet, kuten puberteetti, raskaus ja imetys vaikuttavat umpirauhasten makrofagipopulaatioiden koostumukseen ja toimintaan. Kilpirauhashormoni ottaa osaa hiiren kilpirauhasen makrofagien kypsymisen säätelyyn (Perrotta ja muut 2014). Synnynnäisten immuunisolujen ja kilpirauhashormonin välinen kaksisuuntainen kanssakäyminen vaikuttaa esimerkiksi hiiren kilpirauhasen makrofagien energiametaboliaan (Klein ja Wang 2004; Montesinos ja Pellizas 2019). Lisämunuaisissa taas eräs makrofagipopulaatio katoaa raskaana olleilta naarashiiriltä sekä 4–5 viikon ikäisiltä, eli puberteettisilta, uroshiiriltä (Dolfi ja muut 2022).

Umpirauhasten makrofageilla on myös muiden kudonmakrofagien lailla kudosspesifisiä ominaisuuksia, jotka edesauttavat kudoksensa toimintaa. Esimerkiksi hiiren ruskean rasvakudoksen makrofagit ottavat epäsuorasti osaa ruskean rasvan termogeneesiin eli lämmöntuotantoon (Wolf ja muut 2017). Niin valkoisen kuin ruskeankin rasvakudoksen makrofagit ovat vuorovaikutuksessa ääreishermoston kanssa. Adiposyyttien, eli rasvasolujen, ilmentämien  $\beta$ -adrenergisten reseptorien stimulaatio stimuloi lipolyysistä, eli rasvan hajoamisen, ja indusoi rasvakudoksen makrofagien

proliferaatiota. (Kosteli ja muut 2010; Rehman ja muut 2021.) Sukupuolirauhasten makrofageilla on niin munasarjoissa kuin kiveksissäkin hedelmällisyyteen liittyviä tehtäviä. Munasarjojen makrofagit osallistuvat kaikkiin munasarjojen kierron vaiheisiin, niin munarakkuloiden kehittymiseen gonadotropiinisignaalointiin vaikuttamalla, tunkeutumalla LH:n aikaansaaman ovulaation aikana munarakkuloihin, umpeutuneiden munarakkuloiden poistamiseen osallistumalla, kuin kerääntymällä keltarauhaseen hajoamista eli luteolyysiä varten (Adashi ja muut 1989; Brannstrom ja muut 1994; Z. Zhang ja muut 2021; Duncan ja muut 1998; Oakley ja muut 2010; Townson ja muut 2002). Kun taas hiirten kiveksissä makrofageja tarvitaan alkioaikaiseen spermatogeneesiin, eli siittiöiden muodostukseen, ja verisuonten sekä siementiehyeen muodostumiseen (DeFalco ja muut 2015; Lokka ja muut 2020; Meinhardt ja muut 2022).

Alkuperän ja kudossympäristön lisäksi myös yksilön sukupuoli vaikuttaa makrofagien toimintaan ja makrofagipopulaatioiden koostumukseen. Kuten moneen muuhunkin järjestelmään kehossa, myös immuniteettiin vaikuttaa biologinen sukupuoli. Esimerkiksi naaraat ovat yleensä uroksia terveempiä ja selviytyvät paremmin infektiosairauksista, verenmyrkytyksestä, traumasta ja loukkaantumisista (Guerra-Silveira ja Abad-Franch 2013; McClelland ja Smith 2011; Zuk 2009).

Immuunijärjestelmän tiedetään olevan erilainen uroksissa ja naaraissa, niin ihmisillä kuin hiirilläkin. Tämä sukupuolidimorfismia eli sukupuolten välistä eroavaisuutta on tutkittu myös makrofageissa. Synnynnäisen immuniteetin soluista juuri makrofagit ovatkin dimorfisimpisiä (Gal-Oz ja muut 2019).

Makrofagien alkuperää, toimintaa ja sukupuolidimorfismia on tutkittu vaihtelevasti eri kudoksissa. Sukupuolidimorfismi ja makrofagien toiminta ovat dynaamisia ja siten muuttuvat läpi yksilön elämän. Esimerkiksi lisämunuaisen makrofagit ovat dimorfisia kudokseen sijoittumisessaan, populaatioiden suhteellisuuksissaan ja energiantuotannossaan. Naaraiden lisämunuaisiin myös värvätään monosyyttiperäisiä soluja tasaisemmin kuin urosten lisämunuaisissa. (Dolfi ja muut 2022.) Aivojen mikroglia-solut ovat myös sukupuolidimorfisia ja vaikuttavat osaltaan aivojen sukupuolidimorfismiin. Alkioaikana dimorfismia ei esiinny mikroglia-soluissa, vaan sitä on havaittavissa ohimenevänä vasta syntymän jälkeen, mikä vaikuttaa aivojen dimorfisuuteen koko loppuelämän ajan. Mikroglia-solujen dimorfisuutta esiintyy aivojen eri alueilla, esimerkiksi uroshiirillä hypotalamuksen ns. preoptisen alueen (*engl.* preoptic area) mikroglia-soluja on enemmän kuin naarashiirillä toisena syntymän jälkeisenä päivänä (P2), johtuen syntymän aikaan tapahtuvasta testosteronipulssista (Han ja muut 2021).

## 1.2. Aivolisäke

Aivolisäke on kallonpohjan turkinsatula-nimisessä (*lat.* sella turcica) syvennyksessä sijaitseva umpirauhanen, joka toimii yhdessä hypotalamuksen kanssa säädelläkseen kehon hormonitasapainoa. Tästä syystä aivolisäkettä kutsutaankin usein ns. suurrauhaseksi (*engl.* master gland).

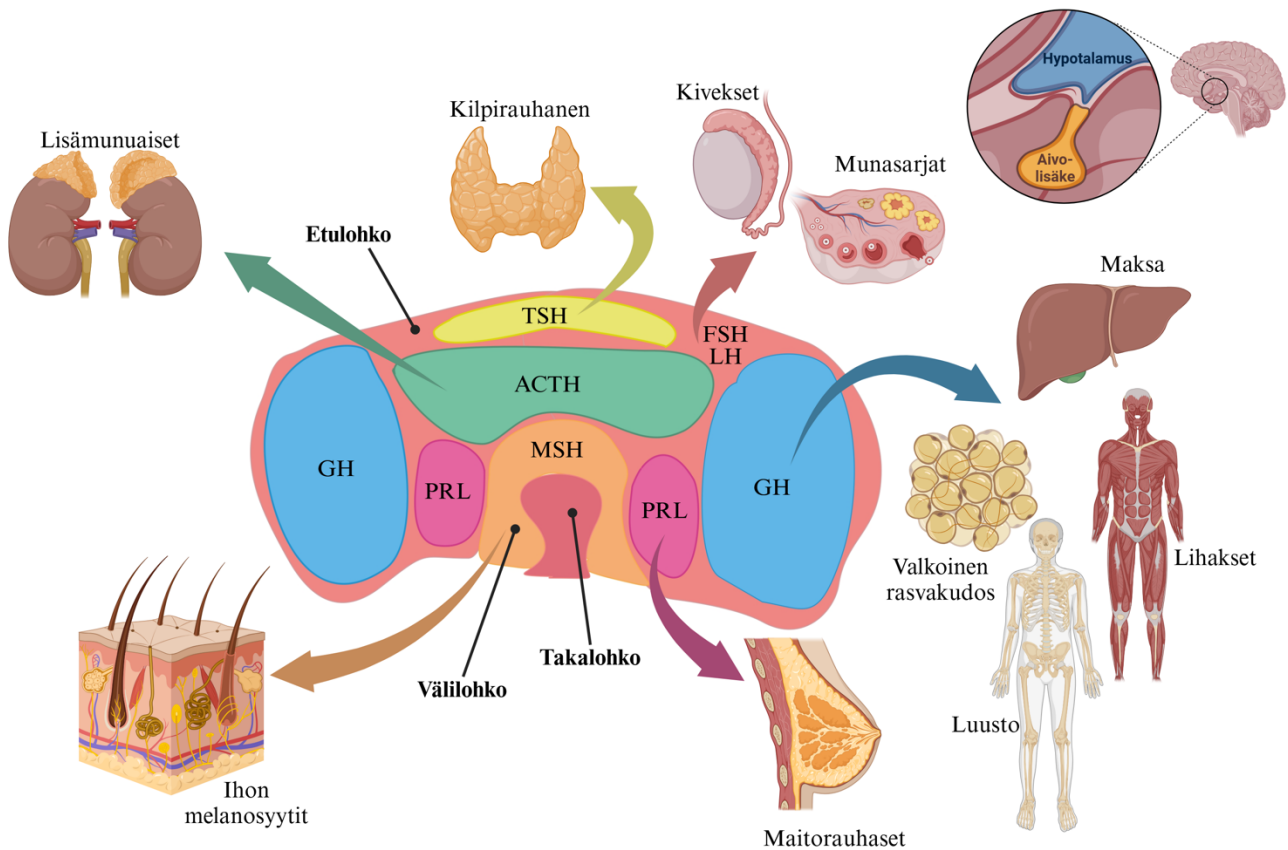
### 1.2.1. Aivolisäkkeen rakenne, toiminta ja kehitys

Aivolisäke koostuu kolmesta lohkosta: etu-, väli- ja takalohkosta (*lat.* adenohypophysis, pars intermedia ja neurohypophysis; *engl.* anterior lobe, intermediate lobe ja posterior lobe, tässä järjestyksessä). Hiirellä kaikki kolme lohkoa ovat selkeästi omia rakenteitaan, kun taas ihmisellä etu- ja välilohkot ovat yhdistyneet toisiinsa, jolloin ihmisen aivolisäkkeen katsotaan muodostuvan vain etu- ja takalohkoista.

Etulohko on umpieritysjärjestelmän kannalta aivolisäkkeen lohkoista merkittävin. Se sisältää viidenlaisia hormonisoluja: somatotrofeja, laktotrofeja, kortikotrofeja, tyreotrofeja ja gonadotrofeja. Näiden solujen tuottamia hormoneja ovat tässä järjestyksessä kasvuhormoni (*engl.* growth hormone, GH), prolaktiini (*engl.* prolactin, PRL), kortikotropiini (*engl.* adrenocorticotrophic hormone, ACTH), tyreotropiini (*engl.* thyroid-stimulating hormone, THS), ja gonadotropiini eli sukupuolirauhasia säätelevät hormonit follikkeleja stimuloiva hormoni eli follitropiini (*engl.* follicle stimulating hormone, FHS) ja luteinisoiva hormoni (*engl.* luteinizing hormone, LH). Kuvantamistekniikoilla on osoitettu hormonisolutyyppien sijoittuvan etulohkoon niille tyypillisin tavoin. Esimerkiksi prolaktiinia tuottavia laktotrofeja on kennomaisissa rakenteita lähellä välilohkoa (Le Tissier ja muut 2012; Larkin ja Ansorge 2000). Aikuisissa hiirissä gonadotrofit sijoittuvat ketjumaisesti etulohkon reuna-alueille (Le Tissier ja muut 2012). Kuvassa 2 nähdään kaikkien näiden hormonisolujen muodostamien tumakkeiden sijainnit ja niiden tuottamien hormonien kohdekudokset (Larkin ja Ansorge 2000; Sasaki ja Iwama 1988).

Välilohko on aivolisäkkeen lohkoista pienin ja sijaitsee nimensä mukaisesti etu- ja takalohkojen välissä, sisältäen melanosyyttejä stimuloivaa hormonia tuottavia soluja, melanotrofeja.

Aivolisäkkeen takalohko koostuu hypotalamuksesta laskeutuvista hermopäätteistä, joissa varastoidaan hypotalamuksessa valmistettuja hormoneja, vasopressiinia ja oksitosiinia, jotka vapautetaan aivolisäkkeen takalohkosta suoraan verenkiertoon (Sheng ja muut 2021; Zhu ja muut 2005).



**Kuva 2. Aivolisäkkeen rakenne, hormonisolujen sijoittuminen etulohkossa, niiden tuottamat hormonit ja hormonien kohdekudokset.** GH, kasvuhormoni; PRL, prolaktiini; ACTH, kortikotropiini; TSH, tyreotropiini; MSH, melanosyyttejä stimuloiva hormoni; FSH, follitropiini eli follikkeleja stimuloiva hormoni; LH, luteinisoiva hormoni. Kuva on tehty BioRender-ohjelmalla.

Muita mainitsemisen arvoisia aivolisäkkeen solutyyppejä ovat follikulostellaattisolut (*engl.* folliculostellate cells, FSCs) ja pituisyytit (*engl.* pituicytes). Follikulostellaattisolut ovat etulohkon agranulaarisia tähdenmuotoisia soluja, jotka muodostavat koko etulohkon kattavan verkoston, jonka yhteydellä ne kykenevät kommunikoimaan toistensa kanssa (Fauquier ja muut 2002; Fauquier ja muut 2001). Ne muun muassa syövät solujätettä ja tukevat muiden aivolisäkkeen solujen toimintaa (Devnath ja Inoue 2008). Pituisyyttejä eli aivolisäkkeen tähtisoluja (*engl.* astrocytes) sijaitsee aivolisäkkeen takalohkossa, jossa ne ympäröivät hermopäätteitä ja muun muassa auttavat säätelemään neuropeptidien eritystä (Rosso ja Mienville 2009). Takalohkossa on viisi morfologisesti toisistaan poikkeavaa pituisyyttipopulaatiota, jotka yhdessä vievät noin 30 % koko takalohkon tilavuudesta (Stojilkovic ja muut 2010; Takey ja Pearl 1984).

Hiirillä aivolisäkkeen kehitys alkaa ajankohtana E7.5 ja ihmisillä raskauden neljännen viikon aikana. Aivolisäke kehittyy alkioaikana neuroektodermista (*lat.* neuroectoderma) ja ektodermista (*lat.* ectoderma). Ektodermista muodostuu ns. Rathken tasku (*engl.* Rathke's pouch), joka lopulta muodostaa etu- ja välilohkot ja neuroektodermista muodostuu takalohko. Hiiren alkiokehityksen

ajankohtana E17.0 aivolisäkkeeseen on muodostunut kaikki kolme lohkoa. Etulohkon hormonisolutyypit erilaistuvat kehityksen eri ajankohtina. Kortikotrofit ovat hormonisolusta ensimmäisinä täysin erilaistuneita, noin ajankohtana E12.5, tyreotrofit noin E14.5, somatotrofit noin E15.5, ja laktotrofit sekä gonadotrofit noin E16.5 (Le Tissier ja muut 2012).

Etulohkon hormonisolut adaptoituvat yksilön kehityksen eri kynnysvaiheisiin, kuten puberteettiin ja imettämiseen. Noin 6–10 viikon ikäisillä uroshiirillä somatotrofien määrä kasvaa runsaasti, sillä niitä tarvitaan puberteetin jälkeiseen kasvutahdin nopeutumiseen (Le Tissier ja muut 2012).

Imettävillä naarashiirillä laktotrofit muodostavat selkeitä kuusikulmion mallisia rakenteita, joissa solut ovat runsaasti kontaktissa toisiinsa (Hodson ja muut 2012; Le Tissier ja muut 2012). Lisäksi imettävien naarashiirten somatotrofit ja laktotrofit molemmat ilmentävät *prl*-geeniä (prolaktiini) enemmän kuin ei-imettävien naarashiirten, mikä kertoo prolaktiinin lisääntyneestä tarpeesta sekä etulohkon hormonisolujen plastisuudesta (Ho ja muut 2020).

### 1.2.2. Aivolisäkkeen makrofagit

Aivolisäkkeen makrofagien, eli pitMØ-solujen (Lehtonen ja muut 2025), olemassaolo on osoitettu jo vuonna 1984 (Hume ja muut 1984). Siitä huolimatta niiden alkuperää, ominaisuuksia ja toimintaa aivolisäkkeessä ei oltu tutkittu, kunnes Lehtonen ja muut (2025) ovat viimeaikaisella tutkimuksellaan valottaneet näitä seikkoja.

PitMØ-solut ovat valtaosin peräisin ruskuaispussista (Lehtonen ja muut 2025). Makrofagit muodostavat aivolisäkkeen suurimman immuunisolupopulaation ja niitä on aivolisäkkeessä jo alkiokehityksen ajankohtana E17.5. Aivolisäke sisältää kuusi makrofagipopulaatiota, joiden morfologia ja sijainti on populaatiokohtaista ja muuttuu kehityksen mukaan. Lisäksi aivolisäkkeessä on kaksi monosyyttipopulaatiota. Aivolisäkkeen kuusi makrofagipopulaatiota ovat Core-MAC, MHCII<sup>Pos</sup>-MAC, ml-MAC, pBAM-MAC, Oxt-MAC ja Inf-MAC, sekä monosyyttipopulaatiot Ly6C<sup>Hi</sup>MO ja Ly6C<sup>Low</sup>MO. Core-MAC-populaatio ilmentää tyypillisimpiä makrofagigenejä, kuten CD14, CD86 ja Il1b. (Lehtonen ja muut 2025.)

PitMØ-soluja löytyy hiiriltä niin etu- kuin takalohkostakin, mutta välilohkosta ei niinkään. PitMØ-solut ovat välillä E17.5 – P14 morfologialtaan pyöreämpiä kuin välillä 2–8 viikkoa, jolloin ne ovat morfologialtaan haaroittuneempia, kuten aivojen mikroglia-solut. (Lehtonen ja muut 2025.)

MHCII<sup>Pos</sup>-MAC-populaatio ilmentää immuunivasteeseen ja vasta-aineiden esittelyyn liittyviä genejä, kuten *H2-Eb1*, *P2ry6*, *MHCII*, *CD74* ja *H2-DMb1*. Nämä kaksi ovat vallitsevia pitMØ-populaatioita kautta aivolisäkkeen kehityksen. (Lehtonen ja muut 2025.) ml-MAC-populaatio eli mikroglia-solujen kaltaiset pitMØ-solut (*engl.* microglia like macrophages) ilmentävät tyypillisiä

mikroglia-solugeenejä, kuten *Sparc*, *Sall1*, *SiglecH*, *P2ry12*, *Olfml3*, *Fscn1* ja *Nav3*. Morfologialtaan ml-MAC-solut ovat mikroglia-solujen kaltaisesti haaroittuneempia kuin makrofagit yleensä. (Lehtonen ja muut 2025.) pBAM-MAC-populaatio on aivojen raja-alueiden makrofagien (*engl. border associated macrophages*, BAM) kaltainen ja siksi se onkin nimetty *pituitary border associated macrophages* -populaatioksi. Tämä populaatio ilmentää siis tyypillisiä BAM-markkereita, kuten *Lyve1*, *CD163* ja *Pf4*. Hiiren vanhetessa tämä populaatio pienenee, vaikka kyseinen populaatio onkin yksi suurimmista aivolisäkkeen aikaisemmassa kehitysvaiheessa. (Lehtonen ja muut 2025.) Oxt-MAC-populaatio ilmentää geenejä, jotka liittyvät oksidatiiviseen fosforylaation, kuten *Cox8a* ja *Cox4i1*. (Lehtonen ja muut 2025.) Inf-MAC-populaatio on varsin pieni pitMØ-alapopulaatio, joka ilmentää interferoni beetaan reagoimiseen ja monosyyttien erilaistumiseen liittyviä geenejä, kuten *Cxc110*. (Lehtonen ja muut 2025.)

Kuten aivojen mikroglia-solut, pitMØ-solut eivät korvaannu ajan myötä monosyyttiperäisillä makrofageilla, vaan ne ylläpitävät populaatiotaan jakautumalla (Ginhoux ja muut 2010; Lehtonen ja muut 2025). Aivolisäkkeeseen ei edes tulehdustilanteessa värvätä veren monosyyttejä, jotka erilaistuisivat makrofageiksi (Lehtonen ja muut 2025).

Aivolisäkkeen makrofagit sijoittuvat kudokseen osittain fenotyyppinsä perusteella. Esimerkiksi, vain takalohkossa esiintyy ml-MAC-populaation soluja, kun taas pBAM-MAC-soluja esiintyy vain etulohkon verisuonten ulkopinnoilla. (Lehtonen ja muut 2025.) Suhteessa etulohkon hormonisoluihin, pitMØ-solut asettuvat myös eri tavoin riippuen hormonisolutyyppistä; pitMØ-solut ympäröivät gonadotrofeja, kun taas tyreotrofien välille ne muodostavat ns. yhteyksiä ulokkeillaan. (Lehtonen ja muut 2025.)

Makrofagien puuttuessa aivolisäkkeestä, kaikkien etulohkon hormonien erittämisessä on nähtävissä laskeva trendi, mutta eritoten gonadotrofien tuottaman luteinisoivan hormonin erityksessä nähdään selkeä lasku (Lehtonen ja muut 2025).

### 1.3. Gonadotrofit ja gonadotropiinit

Hypotalamus on aivojen alaosassa sijaitseva alue, joka ympäröi kolmatta aivokammiota ja se koostuu yhdestätoista tumakkeesta, joista jokainen on osana säätelemässä kehon eri toimintoja, kuten ruokahalua, verenpainetta, ruumiinlämpöä, painoa sekä neste- ja elektrolyyttitasapainoa.

Osa hypotalamuksen tuottamista hormoneista säätelee aivolisäkkeen etulohkon hormonisolujen hormonien tuotantoa, eritystä ja erityksen lakkauttamista. Hypotalamuksen tuottamat hormonit, jotka saavat aikaan aivolisäkkeen hormonien erityksen ovat tyreotropiinia vapauttava hormoni

(*engl.* thyrotropin-releasing hormone, TRH), kortikotropiinia vapauttava hormoni (*engl.* corticotropin releasing hormone, CRH), kasvuhormonia vapauttava hormoni (*engl.* growth hormone releasing hormone, GHRH), prolaktiinia vapauttava hormoni (*engl.* prolactin-releasing hormone, PRH) ja gonadotropiineja vapauttava hormoni (*engl.* gonadotropin releasing hormone, GnRH).

Aivolisäke ja hypotalamus muodostavat useita palauteakseleita muiden hormonikudosten kanssa. Näitä ovat lisämunuaisten (*engl.* hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis, HPA), sukupuolirauhasten (*engl.* hypothalamus-pituitary-gonadal axis, HPG) ja kilpirauhasen (*engl.* hypothalamus-pituitary-thyroid axis, HPT) kanssa muodostetut akselit.

Gonadotrofit ovat yksi aivolisäkkeen etulohkon viidestä hormonisolutyypistä, jotka reagoivat hypotalamuksen GnRH:n stimulaatioon pinnallaan ilmentämänsä GnRH-reseptorin (GnRHR) avulla (Schally 1970). Gonadotrofit poikkeavat muista hormonisolutyypeistä tuottamalla yhden hormonin sijasta kahta hormonia: LH:ta ja FSH:ta, eli sukupuolirauhasia stimuloivia gonadotropiineja. LH:n ja FSH:n erittyminen gonadotrofeista riippuu GnRH:n hypotalamuksesta erittymisen tahdista. Nopea GnRH:n erittymistähti stimuloi LH:n tuotantoa, kun taas GnRH:n hitaampi erittymistähti stimuloi FSH:n tuotantoa. (Fanis ja muut 2023; Stamatiades ja Kaiser 2018.) Molemmat gonadotropiinit ovat glykoproteiineja ja koostuvat kahdesta osasta: yhteisestä  $\alpha$ -osasta (*engl.* common  $\alpha$ -subunit,  $\alpha$ CSU) ja kummallekin hormonille uniikista  $\beta$ -osasta, LH $\beta$  tai FSH $\beta$  (Cicccone ja Kaiser 2009; Gharib ja muut 1990; Stamatiades ja Kaiser 2018).

Gonadotrofit ovat etulohkon hormonisolupopulaatioista toiseksi pienin, niiden kokonaismäärän ollessa noin 10 – 15 prosenttia (Ooi ja muut 2004; Stojilkovic ja muut 2010). Ne sijaitsevat muista etulohkon hormonisoluista poiketen kaikkialla etulohkossa, eivätkä ns. tumakkeisiin keskittyneinä (Cullingford ja muut 2000; Larkin ja Ansorge 2000).

Gonadotropiinit vaikuttavat uroksissa ja naaraissa eri tavoin, sillä ne ovat sukupuolirauhasiin vaikuttavia hormoneja ja siten niillä on uroksissa ja naaraissa eri kohdekudokset. Uroksissa luteinisoiva hormoni stimuloi kivesten testosteronia tuottavia Leydigin soluja erittämään testosteronia (Molitch 2012). Naaraissa luteinisoiva hormoni stimuloi steroidien erittymisen munasarjoista, ovulaatiota ja ovulaation jälkeisen progesteronin eli keltarauhashormonin erittymisen keltarauhasista (Molitch 2012). FSH stimuloi ja ylläpitää uroksissa spermatogeneesiä, eli siittiösolujen muodostumista, yhdessä testosteronin kanssa. Naaraissa FSH edistää estrogeenituotantoa stimuloimalla munasarjojen keltarauhasien granuloosasoluja tuottamaan estrogeenin esiasteita. Lisäksi naaraissa FSH saa aikaan munasarjojen munarakkuloiden kypsymisen. (Molitch 2012.)

Kuten mainittua, gonadotrofin hormonieritys perustuu GnRH:n ja sen reseptorin, GnRHR:n, väliseen vuorovaikutukseen. GnRHR kuuluu GPCR-reseptoriperheeseen (*engl.* G-protein coupled receptor, GPCR), mutta erikoispiirteensä sillä ei ole solunsisäistä karboksyylihäntää, joka on tärkeä reseptorin nopean desensitoinnin ja sisäistämisen kannalta. GnRHR koostuu, kuten GPCR:t yleisestikin, seitsemästä transmembraanisesta  $\alpha$ -heliksistä ja niitä yhdistävistä kolmesta solunsisäisestä ja kolmesta solunulkoisesta silmukasta. Heliksit ja silmukat muodostavat kanavamaisen rakenteen, joka mahdollistaa reseptorin, GnRH:n ja solunsisäisten signaalintiproteiinien keskinäisen vuorovaikutuksen. (Bliss ja muut 2010; Fanis ja muut 2023; Stamatides ja Kaiser 2018.)

Myös muut solut kuin gonadotrofit ilmentävät pinnallaan GnRH-reseptoria. Vatsakalvon makrofagit ilmentävät GnRH-reseptoria pinnallaan ja GnRH-stimulaatio saa niissä aikaan solunsisäisen kalsiumkonsentraation nousemisen (Min ja muut 2009).

Mutaatiot GnRHR:ssä voivat aiheuttaa normosmista hypogonadotropista hypogonadismia (*engl.* normosmic hypogonadotropic hypogonadism), jonka oireena gonadotropiineja ei muun muassa eritetä pulsseissa ja niiden pitoisuudet ovat alhaisempia kuin terveillä yksilöillä. GnRHR:n mutaatiot aiheuttavat häiriöitä koko HPG-akseliin, sillä palautevaikutukset kudosten välillä häiriintyvät. Tämän seurauksena myöskään GnRH:ta ei eritetä normaalisti, mikä johtaa gonadotropiinitasojen alenemiseen ja lopulta liian vähäiseen sukupuolirauhasten stimulaatioon. (Fanis ja muut 2023.)

### 1.3.1. P2XR-, VGCC- ja IP<sub>3</sub>R-reseptorikanavat gonadotrofeissa

Hormonien tuotanto ja erityisesti perustuu solujen väliselle ja sisäiselle signaalinnalle. Aivolisäkkeen etulohkon hormonisoluissa ionikanavat ovat hormonireseptorien lisäksi tärkeässä osassa tätä signaalointia. Gonadotrofeissa GnRH-signaalointiin liittyy kolmen eri tyyppin ionikanavaa: plasmamembraanin jänniteriippuvaiset-kanavat (*engl.* voltage gated channels) sekä purinergiset (*engl.* purinergic) ionikanavat ja solunsisäisen solulimakalvoston ionikanavat. Gonadotrofin GnRHR-signaalinnassa kalsiumkanavat ovat erityisesti tärkeitä, sillä kalsiumsignaali mahdollistaa gonadotropiinien erittämisen gonadotrofeista verenkiertoon muun muassa valmistelemalla erityisgranuloita ja aikaansaaden erityisgranuloiden eksosytoosin (Stojilkovic ja muut 2010).

Jänniteriippuvaiset ionikanavat ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ja  $\text{K}^+$ ) koostuvat kanavan muodostavista  $\alpha$ -alayksikoista ja niiden lisäalayksikoista. Jänniteriippuvaisilla kanavilla on joko transmembraaninen heliksi tai osa, joka toimii ns. jännitesensorina mahdollistaen konformaatiomuutokset kanavassa membraanin

jännitemuutosten perusteella ja siten kanavan aktivoitumisen, ja näin on myös jänniteriippuvaisissa kalsiumkanavissa (Stojilkovic ja muut 2010; Yu ja muut 2005).

Purinerisiä eli ATP:tä toimiakseen vaativia reseptoreja on gonadotrofeissa kahdenlaisia: GPCR adensiinireseptorit, P2YR:t, ja ligandiriippuvaliset reseptorikanavat, P2XR:t, joista P2XR-kanavat ovat GnRHR-signaloinnissa avainasemassa. P2XR:t ovat ligandiriippuvaisia (*engl.* ligand-gated) ionikanavia ja tarvitsevat siten ATP:n ligandikseen aktivoituakseen. P2XR:t koostuvat kolmesta alayksiköstä, P2X1-7, ja reseptorit voivat olla homo- tai heterotrimeerisiä. (Stojilkovic ja muut 2010.) Jokainen alayksikkö koostuu suuresta solunulkopuolisesta osasta, ektodomeenista, kahdesta transmembraanisesta osasta ja solunsisäisistä N- ja C-hännistä (Stojilkovic ja muut 2010). Aivolisäkkeen hormonisoluista P2X2R:a ilmentävät gonadotrofit ja somatotrofit. Gonadotrofeissa reseptorin tehtävänä on aktiopotentiaalin (*engl.* action potential) aikaansaaminen, minkä johdosta solunsisäisen kalsiumin konsentraatio nousee ja siten indusoi gonadotropiinien erittämistä solusta (Stojilkovic ja muut 2010).

Koska ATP hydrolysoituu nopeasti ADP:ksi ja fosfaatiksi ja on siten epästabiili yhdiste, voidaan sitä stabiloida käyttämällä ATP:n hajoamista estävillä tekijöillä, mikä helpottaa ATP:n tutkimista. Näitä hajoamista estäviä tekijöitä ovat esimerkiksi NTPDaasien (*engl.* NTPDases) inhibiittorit, jotka estävät näiden nukleotidifosfaatteja hajottavien entsyymien toiminnan. POM1, eli polyoksoitungstaatti 1 (*engl.* polyoxotungstate 1) on tällainen inhibiittori (Wall ja muut 2008).

ATP:n tärkeydestä GnRHR-signaloinnissa kertoo, että GnRH-stimulaation seurauksena myös ATP:n basaaliaritus gonadotrofeissa nousee, sekä ATP:n samanaikainen erittyminen hypotalamuksesta GnRH:n kanssa lampaissa, joilta on poistettu munasarjat (Stojilkovic ja muut 2017). ATP:tä säilytetäänkin gonadotrofeissa todennäköisesti ns. eritysvesikkeleissä (*engl.* secretory vesicle), joista sitä vapautetaan GnRH-stimulaation yhteydessä, jotta myös P2XR-kanavat päästäisivät kalsiumia gonadotrofiin. (Tomic ja muut 1996; Bliss ja muut 2010.)

Solunsisäisellä solulimakalvostolla ilmennetään IP<sub>3</sub>-reseptorikanavia (*engl.* inositol triphosphate 3 receptor, IP<sub>3</sub>R), jotka vapauttavat kalsiumia solulimakalvoston vesikkeleistä solulimaan (Stojilkovic ja muut 2010). IP<sub>3</sub>R:t muodostavat neliapilamaisen kanavarakenteen neljästä alayksiköstä, minkä ansiosta reseptorikanava on kalsiumspesifinen (Stojilkovic ja muut 2010). IP<sub>3</sub>R-välitteinen kalsiumvirtaus solulimakalvostosta on tasaista kaikissa muissa aivolisäkkeen hormonisoluissa lukuun ottamatta gonadotrofeissa (Stojilkovic ja muut 2000, 2010). Solulimakalvoston kalsiumvarantojen ehtyminen IP<sub>3</sub>R-välitteisten kalsiumpulssien vuoksi saa aikaan kalsiumsyökyksen

soluun solukalvon kalsiumkanavien, kuten VGCC:ien ja P2XR:ien, kautta. Näin solulimakalvoston kalsiumvarantoja saadaan ehdytettyä. (Stojilkovic ja muut 2017.)

### 1.3.2. GnRHR-signalointi

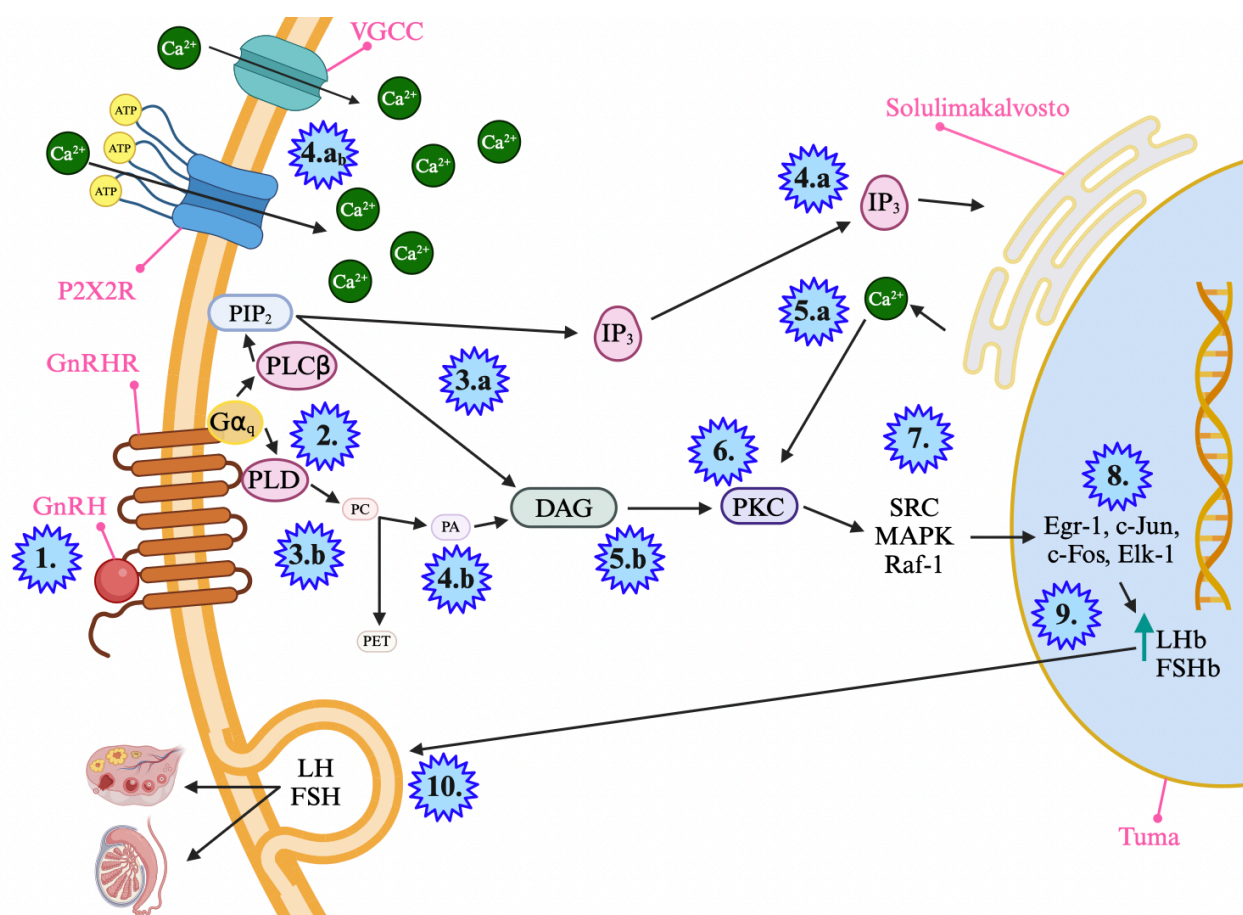
GnRH:ta tuottaa hypotalamuksen GnRH-hermosolut ja sitä vapautetaan aivolisäkkeeseen kulkevaan verenkiertoon ns. hypotalamuksen keskikohoumasta (*engl.* median eminence) (Stamatiades ja Kaiser 2018).

GnRHR-toimintamekanismi on seuraavanlainen (kuva 3). GnRH sitoutuu GnRHR:n ekstrasellulaarisiin eli solun ulkopuolisiin silmukoihin (kuva 3.1), mikä saa aikaan konfiguraatiomuutoksia reseptorissa ja reseptorin intrasellulaariselle eli solun sisäiselle puolelle kiinnittyneen G-proteiinin irtaantumisen reseptorista. G-proteiini aktivoi fosfolipaasi C $\beta$ :n (*engl.* phospholipase C $\beta$ , PLC $\beta$ ) ja fosfolipaasi D:n (*engl.* phospholipase D, PLD) (kuva 3.2), jotka vuorostaan hydrolysoivat omia substraattejaan. PLC $\beta$  hydrolysoi fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaatin (*engl.* phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate, PIP $_2$ ) inositoli-1,4,5-trifosfaatiksi (*engl.* inositol 1,4,5-triphosphate, IP $_3$ ) ja diasyyloglyseroliksi (*engl.* diacylglycerol, DAG) (kuva 3.3.a.), ja PLD hydrolysoi fosfatidylikoliinin (*engl.* phosphatidylcholine, PC) fosfatidihapoksi (*engl.* phosphatidic acid, PA) ja fosfatidylietanoliksi (*engl.* phosphatidylethanol, PET) (kuva 3.3b.). IP $_3$  kulkeutuu solunsisäiseen solulimakalvostoon (kuva 3.4.a.), jossa se saa aikaan kalsiumin vapautumisen solulimaan solulimakalvoston kalsiumvarannoista (kuva 3.5.a.). Tämä kalsiumpulssi myös aktivoi proteiinikinaasi C:tä (*engl.* protein kinase C, PKC) (kuva 3.6.). (Bliss ja muut 2010; Fanis ja muut 2023; Stamatiades ja Kaiser 2018.)

Tämän yhteydessä solun ulkopuolelta alkaa virrata kalsiumia soluun P2XR- ja jänniteriippuvaisten kalsiumkanavien kautta (kuva 3.4.ab). P2X2R-kanava vaatii kolmen ATP-molekyylin sitoutumisen sen solunulkoisiin silmukoihin päästääkseen kalsiumia lävitseen. (Stojilkovic ja muut 2010.) Tämä solun ulkopuolelta virtaava kalsium takaa tasaisemman kalsiumsaatavuuden ja saa solunsisäisen kalsiumkonsentraation nousemaan tarpeeksi korkealle hormonien erittämisen takaamiseksi.

PA:sta tuotetaan myös DAG:ia (kuva 3.4.b.). DAG aktivoi PKC:n (kuva 3.6.), joka saa aikaan mitogeneeniaktivoituneen proteiinikinaasin, SRC-kinaasin ja Raf-1-kinaasin aktivoitumisen (kuva 3.7.). Tämä johtaa transkriptiotekijöiden, kuten Egr-1, c-Jun, c-Fos ja Elk-1, fosforylaatioon (kuva 3.8.) ja siten aktivaatioon, minkä ansiosta LH $\beta$ :n ja FSH $\beta$ :n tuotanto tapahtuu (kuva 3.9.). Valmiit hormonit eritetään verenkiertoon solun sisäisistä vesikkeleistä, minkä kautta ne kulkeutuvat sukupuolirauhasiin (kuva 3.10.) ja muihin kohdekudoksiinsa. (Bliss ja muut 2010; Fanis ja muut 2023; Stamatiades ja Kaiser 2018.)

DAG:n muodostuminen johtaa myös PKC isotsyymien (*engl.* isozyme) aktivaatioon ja edesauttaa solunsisäisen kalsiumkonsentraation tasaisempaa nousua VGCC-kanavien avulla, sillä VGCC-välitteinen kalsiumin sisäänvirtaus on osittain PKC-isotsyymien toiminnasta riippuvainen (Mulvaney ja muut 1999). (Bliss ja muut 2010)



**Kuva 3. Gonadotropiineja vapauttavan hormonin (*engl.* gonadotropin releasing hormone, GnRH) toimintamekanismi gonadotrofeissa.** (1.) GnRH sitoutuu GnRHR:n solun

ulkopuoliseen/ekstrasellulaariseen häntään, mikä saa aikaan GnRHR:n solunsisäiseen/intrasellulaariseen domeeniin sitoutuneen  $G\alpha_q$ -proteiinin irtaantumisen reseptorista, mikä johtaa fosfolipaasi C $\beta$ :n (PLC $\beta$ ) ja fosfolipaasi D:n (PLD) aktivaation (2.). PLC $\beta$  hydrolysoi fosfatidyli-inositoli-4,5-bifosfaatin (PIP $_2$ ) inositoli-1,4,5-trifosfaatiksi (IP $_3$ ) ja diasyyliglyseroliksi (DAG) (3.a). IP $_3$  kulkeutuu solulimakalvostoon (4.a), jossa se saa aikaan kalsiumin vapautumisen solulimakalvoston kalsiumvarannoista (5.a). Miltei välittömästi tämän jälkeen solun ulkopuolelta virtaa sisään lisää kalsiumia VGCC- (*engl.* voltage gated calcium channel) ja P2X2R-kanavien kautta (4.a<sub>b</sub>). PLD hydrolysoi solukalvon fosfatidylikoliinin (PC) fosfatidylietanoliksi (PET) ja fosfatidihapoksi (PA). PA:n tuotanto johtaa DAG:in lisätuotantoon (5.b). DAG aktivoi proteiinikinaasi C:tä (PKC) (6.), joka saa aikaan mitogeneeniaktivoitun proteiinikinaasin, SRC-kinaasin ja Raf-1-kinaasin aktivoitumisen (7.). Näiden kinaasien aktivaatio johtaa lopulta transkriptiotekijöiden (Egr-1, c-Jun, c-Fos, Elk-1) fosforylaatioon ja siten aktivaatioon (8.), mikä lopulta saa aikaan LH $\beta$ :n ja FSH $\beta$ :n tuotannon (9.). Lopulta tuotetut hormonit eritetään solunsisäisistä vesikkeleistä solun ulkopuolelle, verenkiertoon ja sukupuolirauhasiin, munasarjoihin ja kiveksiin (10.). Kuva on tehty BioRender-ohjelmalla.

Signalointi jatkuu, kunnes sukupuolirauhasten erittämien hormonien (estrogenin, keltarauhashormonin ja testosteronin) pitoisuudet ovat veressä niin korkeat, että ne inhiboivat hypotalamuksen GnRH:n tuotantoa (Gupta ja muut 2021).

## 1.4. Tutkimuksen tavoitteet

Mekanismia, jolla aivolisäkkeen makrofagit ovat osassa gonadotrofien hormonituotannon säätelyä ei tiedetä. Pia Rantakarin tutkimusryhmässä tehdyn tutkimuksen perusteella tiedetään, että evättäessä makrofagien pääseminen aivolisäkkeeseen alkion kehityksen varhaisessa vaiheessa (E6.5), eritoten aivolisäkkeen etulohkon gonadotrofien tuottaman luteinisoivan hormonin erityys laskee. Aivolisäkkeen makrofagit ovat siis osallisia gonadotrofien hormonitoiminnan säätelyyn, mutta tarkkaa mekanismia ei tiedetä. Tässä tutkielmassa tätä mekanismia haluttiin tutkia tarkemmin.

Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena olikin tarkastella aivolisäkkeen makrofagien osallisuutta gonadotrofien hormonitoimintaan. Tätä varten optimoitiin protokolla koejärjestelylle, jossa mitattiin pitMØ-solujen ja gonadotrofien in vitro -primäärikasvatuksista ATP-konsentraatioita ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyiden jälkeen. Primäärikasvatuksissa voitiin tarkastella spesifisesti juuri aivolisäkkeen makrofagien ja gonadotrofien kanssakäymistä kudoksen viitekehyyksen ulkopuolella, ja ATP-konsentraatiot kertovat epäsuorasti gonadotrofien hormonitoiminnan aktiivisuudesta. Näin ollen tutkielman tavoitteet olivatkin:

- 1. Optimoida GnRHR-primäärivasta-aineen käyttö virtaussytometriassa fluorokromikonjugoidun vasta-aineen kanssa*
- 2. Selvittää, ilmentävätkö pitMØ-solut GnRH-reseptoria*
- 3. Optimoida pitMØ-solujen ja gonadotrofien fluoresenssiaktivoidun lajittelun protokolla*
- 4. Arvioida, miten ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyt vaikuttavat pitMØ-solujen ja gonadotrofien ATP-aineenvaihduntaan in vitro*

## 2. Materiaalit ja metodit

### 2.1. Hiiret

Työssä käytettiin 5 viikon - 8 kuukauden ikäisiä naaras- ja uroshiiriä hybriditaustaisesta Ms4a3 Cre x Tomato lox x Cx3cr1-EGFP (x Cebpb lox) ja yleisesti käytetystä sisäsiittoisesta C57BL/6NRj (6N, Janvier Labs) kannoista. Hiiriä kasvatettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa standardiolosuhteiden vallitessa/standardiolosuhteissa. Huoneiden ilmankosteus oli  $55 \% \pm 15 \%$  ja lämpötila  $+21 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ . Valorytmi oli normaali siten, että valoa oli 12 h (klo 07:00 – 19:00) ja pimeää 12 h. Kaikki eläinkokeet suoritettiin Aluehallintoviraston valtakunnallisen hankelupalautakunnan hyväksymän tavoin (hankelupanumero 23546/2023) ja EU-lainsäädännön mukaisesti noudattaen EU-direktiiviä 2010/63/EU. Hiiret lopetettiin hiilidioksidilla.

### 2.2. Jääleikevärjäykset

#### 2.2.1. Näytteiden kerääminen ja valmisteleminen

Aikuiset hiiret lopetettiin hiilidioksidilla, minkä jälkeen hiiret perfusoiitiin ensin 1x fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (*engl.* phosphate buffered saline, PBS; *gibco*) ja sitten 4 %:lla paraformaldehydillä (PFA; *ChemCruz*). Kallonpohja kerättiin kokonaisuudessaan aivolisäke vielä siinä kiinni ja laitettiin 24-kuoppalevyn kaivoihin, joissa oli kylmää 1x PBS-liuosta. Tämän jälkeen näytteet pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella siten, että aivolisäkkeet irrotettiin kallonpohjista toisen pesun jälkeen. Pesujen aikana näytteitä pidettiin tasoravistelijassa (100 Mot./min, KS 501 D, *Jank & Kunkel*)  $+4^\circ\text{C}$ :ssa.

Näytteistä tehtiin kryotomilla leikkaamiseen sopivia paloja heti pesujen jälkeen upottamalla ne OCT<sup>TM</sup>-väliaineeseen (Optimal Cutting Temperature compound, OCT; Tissue-Tek®) ja jäädyttämällä kuivajäällä, näytteet säilöttiin  $-70^\circ\text{C}$ :een.

Näytteet leikattiin kryotomilla. Ennen leikkaamisen aloittamista näytteiden annettiin olla kryotomin leikkuukammiossa  $-15^\circ\text{C}$ :ssa 45–90 minuutin ajan. Leikkaamisen ajaksi leikkuukammion lämpötila laskettiin  $-20^\circ\text{C}$ :seen. Näytteistä leikattiin viiden  $\mu\text{m}$ :n paksuisia leikkeitä, jotka kiinnitettiin laseihin pitämällä laseja asetonissa viiden minuutin ajan. Näytteiden annettiin kuivua huoneenlämmössä ja säilöttiin  $-70^\circ\text{C}$ :een.

#### 2.2.2. Leikkeiden värjääminen

Mikroskooppilaseilla olleiden näytteiden ympärille piirrettiin vahaympyrät ja näytteet kiinnitettiin laseihin inkuboimalla niitä 2 %:lla PFA-liuoksessa, huoneenlämmössä 15 minuutin ajan. Näyteleikkeet pestiin PBS-liuoksella. Pesun jälkeen näytteitä blokattiin vasta-aineiden

epäspesifiseltä sitoutumiselta huoneenlämmössä pimeässä kosteuskammiossa yhden tunnin ajan vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista estävässä puskurissa. Ensimmäisessä toistossa käytettiin seuraavaa puskuria: 1 % FCS (*engl.* fetal calf serum, naudun alkion seerumi; *Biowest*), 1 % NMS (*engl.* normal mouse serum, normaali hiiren seerumi; *Jackson ImmunoResearch*), 1 % tai 5 % NGS (*engl.* normal goat serum, normaali vuohen seerumi; *Jackson ImmunoResearch*) ja 0,3 % Triton-X (*Sigma*) liuotettuna 1x PBS-liuokseen. Blokkauksiin poistettiin laseilta takomalla lasien pitkää reunaa pöytää vasten. Näyteleikkeille lisättiin blokkauksiin valmistettua primäärisiä vasta-aineita (taulukko 2) sisältävää liuos ja näyteleikkeitä inkuboitiin pimeässä kosteuskammiossa +4°C:ssa yön yli.

Taulukko 2. Jääleikkeiden värjäämiseen käytetyt vasta- ja väriaineet.

Väriaine	Tyyppi	Fluorokromi	Isäntä -eläin	Valmistaja ja tuotenumero	Käyttö- laimennos
GnRHR	Primäärinen vasta- aine	-	Kani	proteintech, 19950–1- AP	1:500 1:1000
LHβ	Primäärinen vasta- aine	-	Kani	A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program	1:1000
AF488	Sekundäärinen vasta-aine	AF488	Vuohi	Life technologies, A11034	1:500
AF546	Sekundäärinen vasta-aine	AF546	Vuohi	Invitrogen, A11035	1:500
AF647	Sekundäärinen vasta-aine	AF647	Vuohi	Invitrogen, A27040	1:500
DAPI	Nukleaarinen väriaine	-	-	Invitrogen	1:5000

Seuraavana päivänä näyteleikkeet pestiin kolmesti kolmen minuutin ajan 0,1 %:lla Triton-X-PBS-liuoksella ja lopuksi huuhdeltiin kastamalla lasit 1x PBS-liuoksessa. Laseille lisättiin fluorokromikonjugoituja sekundäärisiä vasta-aineita (taulukko 2) sisältävää liuosta ja näytteitä inkuboitiin pimeässä kosteuskammiossa huoneenlämmössä yhden tunnin ajan. Inkubaation jälkeen

näyteleikkeet pestiin jälleen kolmesti kolmen minuutin ajan 0,1 %:lla Triton-X-PBS-liuoksella ja lopuksi huuhdeltiin kastamalla lasit PBS-liuoksessa. Laseille lisättiin PBS:ään liuotettua DAPI-väriainetta (*Invitrogen*) (taulukko 2) ja näytteitä inkuboitiin pimeässä kosteuskammiossa huoneenlämmössä kymmenen minuutin ajan. Inkubaation jälkeen näyteleikkeet huuhdeltiin kastamalla lasit kerran 1x PBS-liuoksessa ja kerran deionisoidussa vedessä. Näyteleikkeiden kuivuttua huoneenlämmössä ne preparoitiin Mounting Prolong Gold antifade -kiinnitysaineella (*Invitrogen*). Näyteleikkeitä säilytettiin pimeässä ja +4°C:ssa niiden kuvantamiseen asti.

Näytteet kuvannettiin LSM800 konfokaalimikroskoopilla (*Zeiss*) AxioObserver mikroskoopilla, käyttäen Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 - ja LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27 -objektiiveja, huoneenlämmössä ilman immersiota ja glyseroli-immersiolla ZEN 2.3 (blue edition) ohjelmistolla.

### 2.3. Kudosten käsitteleminen virtausytometriaa varten

#### 2.3.1. Kudosten kerääminen ja käsitteleminen

Aikuisista hiiristä kerättiin aivolisäke kylmään HBSS-liuokseen (*engl.* Hank's Balanced Salt Solution, Hankin tasapainotettu suolaliuos; *Sigma Life Science*) ja perna kylmään PBS-liuokseen. Fenotyypittävää virtausytometriaa varten aivolisäkkeiden etu- ja takalohkot erotettiin toisistaan mikroskoopin alla, joista vain etulohko kerättiin talteen. Aivolisäkkeen etulohko hajotettiin mekaanisesti suspensoimalla edestakaisin ja entsyymaattisesti lisäämällä kollagenaasi D:tä (10 mg/ml; *Roche, Saksa*) ja DNAasi 1:tä (2 mg/ml; *Roche*). Näytteitä inkuboitiin 30 minuutin ajan (+37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Inkubaation jälkeen näytteet homogenisoitiin pipetoimalla edestakaisin ja näytteet suodatettiin silkkikankaan (tiheys 77 µm) läpi virtausytometriaputkeen. Näytteet sentrifugoitiin putken pohjalle (1006 g, 1,5 min) ja pestiin kerran HBSS-liuoksella entsyymien poistamiseksi, minkä jälkeen näytteet sentrifugoitiin uudestaan ja lopulta eluoitiin HBSS-liuokseen (300 µl).

Perna kerättiin kylmään PBS:ään. Pernan rakenne hajotettiin mekaanisesti puskemalla perna metalliverkon läpi petriimaljalle. Petriimaljalta solususpensio siirrettiin putkeen ja näyte pelletöitiin sentrifugoimalla (1006 g, 1,5 min). Näytteelle tehtiin hemolyysi lisäämällä 0,2 %:sta NaCl-liuosta putkeen ja vorteksoimalla näytettä noin 15 sekunnin ajan, minkä jälkeen putkeen lisättiin 1,6 %:sta NaCl-liuosta siten, että NaCl-liuosten suhde putkessa oli 1:1, ja näytettä vorteksoitiin jälleen. Näyte pelletöitiin sentrifugoimalla ja pestiin kerran 1x PBS-liuoksella. Lopuksi näyte eluoitiin 1,5 MLL:ään 1x PBS-liuosta ja jaettiin kahteen osaan. Toinen näistä osista laitettiin lämpökäsittelyyn (50–60 °C) solujen tappamiseksi noin 10 minuutin ajaksi, minkä jälkeen osat yhdistettiin samaan putkeen.

### 2.3.2. Kudosten värjääminen

Ennen värjäystä näytteet sentrifugoitiin putken pohjalle ja pestiin kerran PBS-liuoksella. Tämän jälkeen aloitettiin solujen värjääminen siirtämällä solut U-pohjaisen 96-kuoppalevyn kuoppiin ja näytteet sentrifugoitiin kuoppien pohjalle (1500 rpm, 3 min; Eppendorf Centrifuge 5810 R). Näytteisiin lisättiin PBS-liuokseen liuotettua eläväsolumarkkeria (Fixable Viability Dye eFluor® 780 (#65-0865), laimennossuhde 1:1000, *eBioscience*) kuolleiden solujen värjäämiseksi ja näytteitä inkuboitiin kylmässä valolta suojattuna 30 minuutin ajan, minkä jälkeen näytteet sentrifugoitiin ja pestiin kahdesti EPICSI-liuoksella (EPICSI-liuoksen valmistusohjeet ovat esillä *liitteessä 1*) siten, että pesujen välissä solut pelletöitiin sentrifugoimalla näytekaivon pohjalle, kaatamalla supernatantti pois ja suspensoimalla solut kuoppaan jäljelle jääneeseen pesuliuokseen. Ensimmäisessä toistossa 30 minuutin inkubaation aikana GnRHR-primääri- ja AF546-fluorokromikonjugoitu sekundäärivasta-aineet yhdistettiin samaan putkeen ja niitä inkuboitiin pimeässä 30 minuutin ajan, jotta vasta-aineet konjugoituisivat toisiinsa.

Värjäämätön kontrollinäyte oli valmis tässä vaiheessa, värjäystä jatkettiin muiden näytteiden kanssa. Näytteisiin lisättiin leimaamatonta CD16/32-vasta-ainetta (laimennossuhde 1:100, EPICSI-liuokseen valmistettu, *InVivoMab*) estämään antigeenispesifisten vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista FcyIII- ja FcyII-reseptoreihin, ja näytteitä inkuboitiin kylmässä valolta suojattuna 5 minuutin ajan. Inkubaation jälkeen näytteisiin lisättiin primäärivasta-aine (taulukko 3) EPICSI-liuokseen liuotettuna ja näytteitä inkuboitiin kylmässä valolta suojattuna 30 minuutin ajan, minkä jälkeen näytteet pestiin EPICSI-liuoksella. Pesun jälkeen näytteisiin lisättiin sekundäärivasta-aine (taulukko 3) EPICSI-liuokseen liuotettuna ja näytteitä inkuboitiin kylmässä valolta suojattuna 30 minuutin ajan. Inkubaation jälkeen näytteet pestiin ja niihin lisättiin konjugoidut vasta-aineet (taulukko 3) EPICSI-liuokseen liuotettuina ja näytteitä inkuboitiin kylmässä valolta suojattuna 30 minuutin ajan. Lopuksi solut pestiin ja suspensoitiin 300 µl:ään EPICSI- tai EPICSI + 5 µM EDTA-liuosta. Lopuksi solut pestiin edellä kuvatulla tavalla ja pesujen jälkeen eluoitiin EPICSI-liuokseen. Näytteiden virtausytometria-ajo tehtiin heti värjäyksen päätyttyä BD LSR Fortessa -virtausytometrillä, minkä jälkeen tulokset analysoitiin FlowJo-ohjelmalla (versio 10, FlowJo, Treestar Inc).

Taulukko 3. Virtaussytometriassa käytetyt vasta-aineet

Antigeeni	Tyyppi	Fluorokromi	Isäntäeläin	Valmistaja ja tuotenumero	Käyttö-laimennos
GnRHR 1°	Primäärinen vasta-aine	-	Kani	proteintech 19950–1-AP	1:100
α-rabbit-AF546 2°	Sekundäärinen vasta-aine	AF546	Vuohi	Invitrogen A11035	1:400
CD45	Konjugoitu vasta-aine	PerCP-Cy5,5	Rotta	BD 550994	1:200
CD11b	Konjugoitu vasta-aine	BV786	Rotta	BD 740861	1:400
F4/80	Konjugoitu vasta-aine	AF488	Rotta	eBioscience 53–4801–82	1:200
MHCII	Konjugoitu vasta-aine	BV711	Rotta	BD 563414	1:200
CD206	Konjugoitu vasta-aine	BV650	Rotta	BioLegend 565250	1:200
Ly6C	Konjugoitu vasta-aine	AF647	Rotta	Elabscience E-AB-F1121M	1:200

Kompensaatioiden tekemiseksi solulajittelijoille, valmistettiin myös yksittäisvärjätty kompensatiohelmet. Kompensaatiohelmien värjäys aloitettiin lisäämällä helmiä sisältävää liuosta (UltraComp eBeads™, *ThermoFisher Scientific Life Technologies*) virtaussytometriaputkeen, sentrifugoimalla (1006 g, 5 min) helmet putken pohjaan, pesemällä ne kerran EPICSI-liuoksella ja kaatamalla supernatantti pois. Pesun jälkeen putkiin lisättiin vasta-aineet (taulukko 2) EPICSI-liuokseen liuotettuina, helmiä inkuboitiin kylmässä valolta suojattuina 15 minuutin ajan. Helmien värjäämistä varten GnRHR-primäärivasta-ainetta ja AF546-fluorokromikonjugoitua sekundäärivasta-ainetta inkuboitiin toistensa kanssa samassa putkessa noin 30 minuutin ajan, jotta niitä voitiin käyttää konjugoitujen vasta-aineiden lailla. Inkubaation jälkeen helmet sentrifugoitiin, supernatantti kaadettiin pois, minkä jälkeen helmet pestiin kahdesti. Lopulta helmet suspensoitiin 300 EPICSI-liuokseen.

## 2.4. Solujen fluoresenssiavusteinen lajittelu

### 2.4.1. Solujen lajittelu

Gonadotrofien ja pitMØ-solujen lajittelu tehtiin sekä SONY SH800 BSL2 - ja BD Discover -solulajittelijoilla. Lajittelu tehtiin joko putkista U-pohjaiselle 96-kuoppalevyille tai Eppendorf-putkiin, joissa oli joko DMEM:ia (*gibco*) ja 10 % FCS:ää (*Biowest*) sisältävää mediumia tai yön-yli-

mediumia (DMEM/F12 (*gibco*) + 10 % FCS (*Biowest*) + 100 IU/ml penisilliini + 100 µg/ml streptomysiini (100x P/S, *Euroclone*) + 1x GlutaMax (100x; *gibco*)). Ennen mediumien valmistamista FSC lämpökäsiteltiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkissa 55–60°C:ssa 5–10 minuutin ajan sekoittamalla putkia käsittelyn puolessa välissä.

Molemmissa solulajittelijoissa käytettiin 100 µm:n suutinta (*Becton Dickinson*) solujen lajittelemiseen.

#### 2.4.2. Solujen jakaminen primäärikasvatuksiin

Lajitellut solut jaettiin U-pohjaiselle 96-kuoppalevyille siten, että kussakin yhteiskasvatuskaivossa hormonisoluja ja makrofageja oli suhteessa 2:1 tai 1:1. Yksittäiskasvatuskaivoissa, joihin jaettiin vain jompaakumpaa solutyyppeä, yhtä solutyyppeä laitettiin kaivoon sama määrä kuin yhteiskasvatuskaivoihin.

### 2.5. ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyt ja ATP-mittaukset primäärikasvatuksista

#### 2.5.1. ATP- ja GnRH-käsittelyt ja näytteiden kerääminen

Kaivoihin jakamisen jälkeen solujen annettiin levätä inkubaattorissa (+37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) 30–60 minuutin ajan tai yön yli. Kaivoihin lisättiin valmistettuja 0,5–1 µM ATP:tä (ATP disodium salt hydrate, *Sigma-Aldrich*), 10 µM GnRH:ta (LHRH acetate salt, *BACHEM*) ja 10 µM POM1:tä (2689, LOT# 2A/204874, *Tocris bioscience*) sisältäneitä indusointimediumeja, minkä jälkeen soluja inkuboitiin mediumien kanssa. Esitetyissä aikapisteissä (0, 5, 15, 30, 45, 60, 80, 120 ja 210 min) kerättiin 20–60 µl:n näyte, joka laitettiin valkoiselle tasapohjaiselle fosforisoimattomalle 96-kuoppalevyille ja näytteen päälle lisättiin 100 µl BSS-puskuria (BSS; basal salt solution; 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 5 mM glukoosia ja 0,1 % BSA; pH 7.4).

#### 2.5.2. ATP-mittaukset

ATP-tasojen mittaamiset kerätyistä näytteistä tehtiin ATPLite 1step Lumiscence Assay kitillä (*Revvity*) valmistajan ohjeiden mukaan. Kalibraatiokäyrät ATP:lle valmistettiin jokaisen kokeen alussa. Näytteiden luminesenssi mitattiin Tecan Infinite M200 mikrolevylukijalla.

### 3. Tulokset

#### 3.1. GnRHR-primäärivasta-aine toimii parhaiten AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa virtaussytometriassa ja immunohistokemiallisissa värjäyksissä

Gonadotrofit ilmentävät pinnallaan reseptoria hypotalamuksen erittämälle GnRH-hormonille, joka saa aikaan gonadotropiinien FSH:n ja LH:n tuotannon. GnRH-reseptorin osoittamiseksi soluista käytettiin GnRHR-primäärivasta-ainetta ja sen kanssa fluorokromikonjugoitua sekundäärivasta-ainetta, sillä valmiiksi fluorokromikonjugoitua vasta-ainetta hiirelle ei ollut saatavilla. Tavoitteena oli optimoida GnRHR-primäärivasta-aine fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa. Tätä varten käytettiin immunohistokemiallisia kudisleikevärjäyksiä ja virtaussytometrasta analyysia.

##### 3.1.1. GnRHR-primäärivasta-aine toimii AF488- ja AF546-fluorokromikonjugoitujen sekundäärivasta-aineiden kanssa immunohistokemiallisissa kudisleikevärjäyksissä

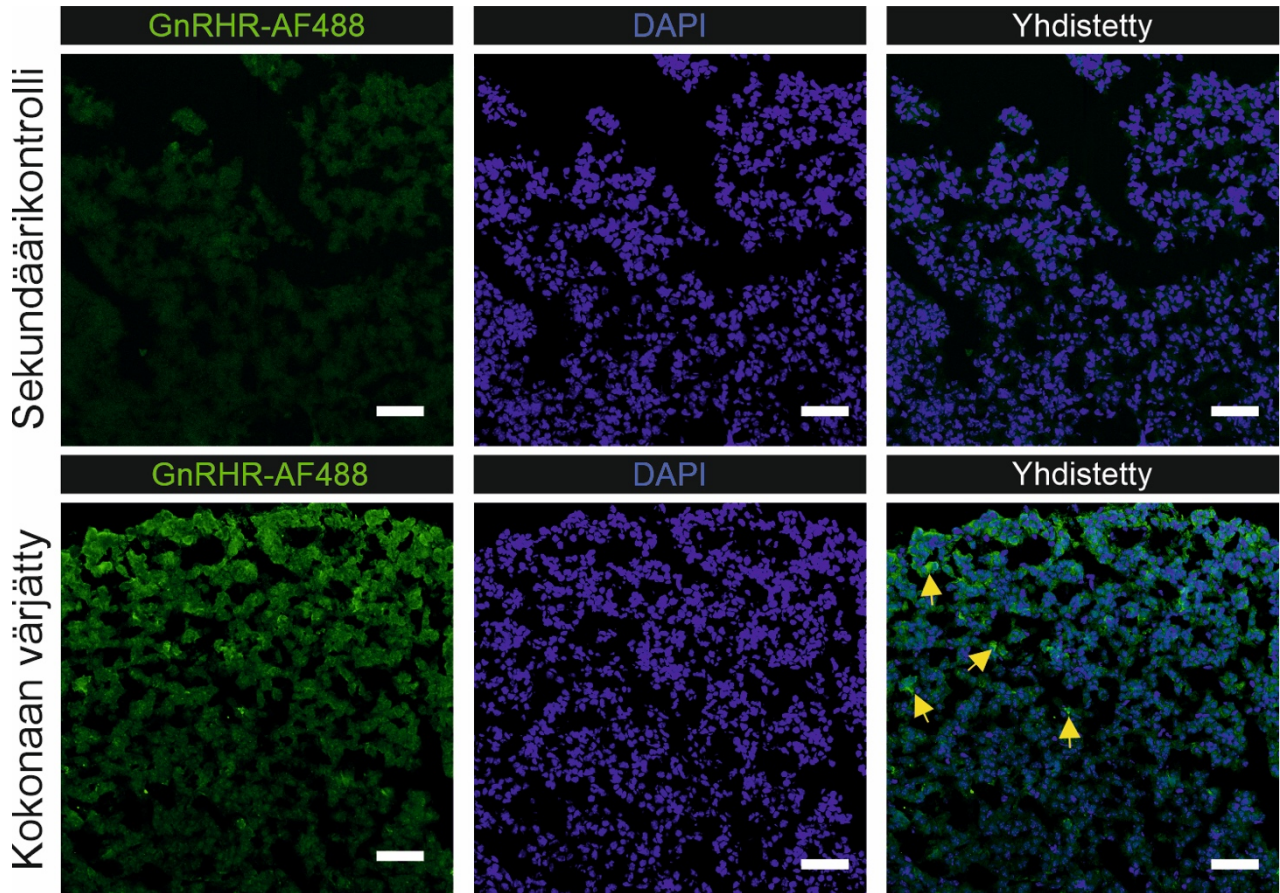
Immunohistokemiallisilla värjäyksillä kudisleikkeitä voidaan värjätä esimerkiksi fluorokromikonjugoiduilla vasta-aineilla, joiden avulla kudoksesta voidaan osoittaa haluttuja solupopulaatioita, niiden määriä kudoksessa ja lokalisaatiota kudoksessa. Kudisleikkeet ovat hyvä tapa tutkia edellä mainittuja tekijöitä, mutta metodin heikkoutena on leikkeiden kaksikulotteisuus, jonka vuoksi solujen todellista sijoittumista esimerkiksi toistensa ympärille voi olla varsin hankalaa osoittaa.

Aivolisäkkeestä tehdyillä jääleikevärjäyksillä testattiin eri sekundäärivasta-aineiden toimivuutta GnRHR-primäärivasta-aineen kanssa immunohistokemiallisesti. Värjäyksiä tehtiin kudisleikkeillä, jotta voitiin nähdä GnRHR-vasta-aineen lokalisaatio aivolisäkkeessä (kuva 4, 5 ja 6).

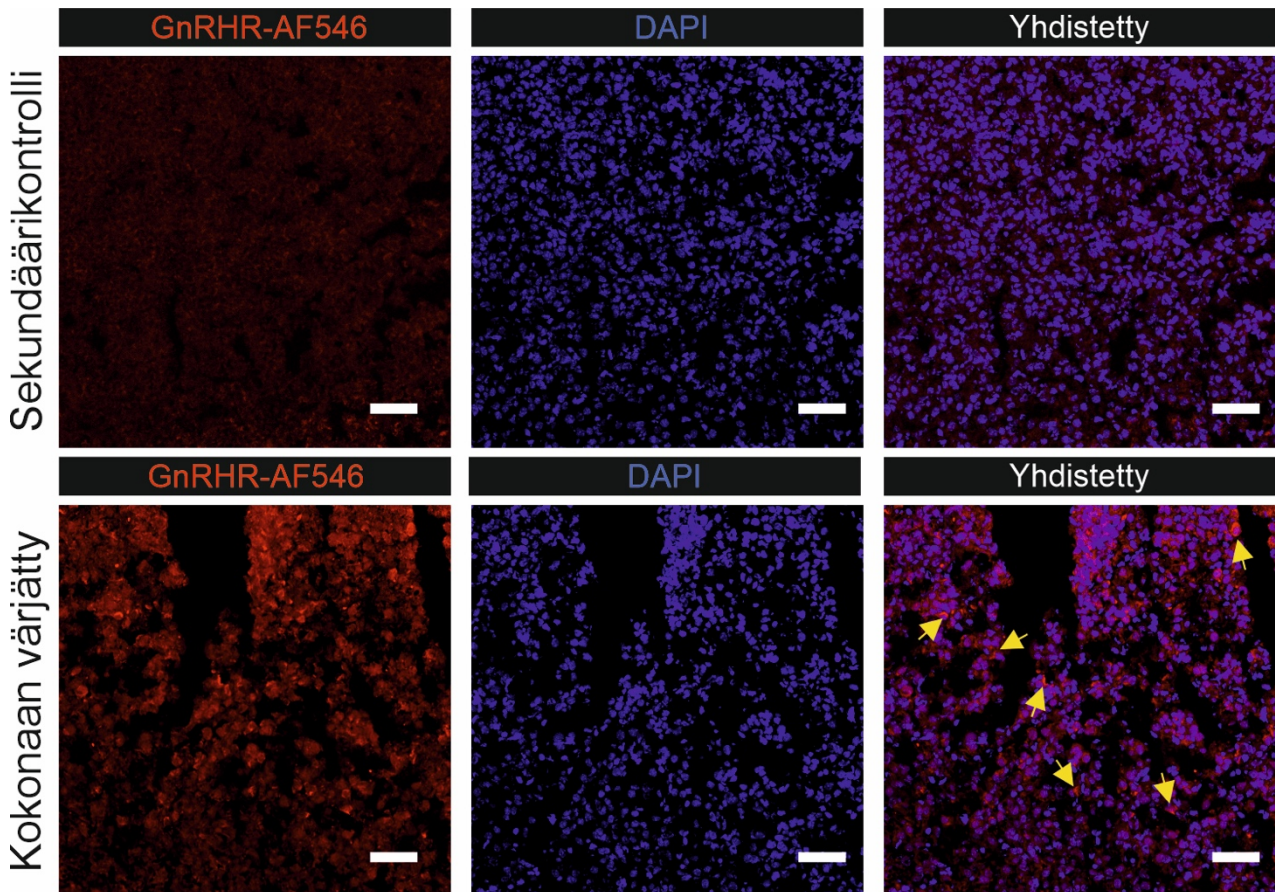
Kaikissa fluorokromikonjugoiduilla vasta-aineilla tehdyissä sekundäärikontrollivärjäyksissä (kuva 4, 5 ja 6), sekundäärivasta-aineiden signaalit ovat himmeitä ja siten osoittavat kokonaan värjättyjen näytteiden fluorokromikonjugoitujen sekundäärivasta-aineiden olevan toimivia.

Sekundäärikontrollinäytteissä on kuitenkin hieman taustasignaalia, joka todennäköisesti johtuu näytteeseen pesuista huolimatta jääneestä fluorokromikonjugoidusta sekundäärivasta-aineesta (kuva 4, 5 ja 6). Kuvista 4 ja 5 nähdään AF488- ja AF546-fluorokromikonjugoitujen sekundäärivasta-aineiden antavan kirkkaampaa signaalia ja siten toimivan paremmin GnRHR-primäärivasta-aineen

kanssa kuin AF647-fluorokromikonjugoidun (kuva 6) sekundäärivasta-aineen, jonka signaali on heikompaa kuin AF488- ja AF546-fluorokromikonjugoitujen sekundäärivasta-aineiden.

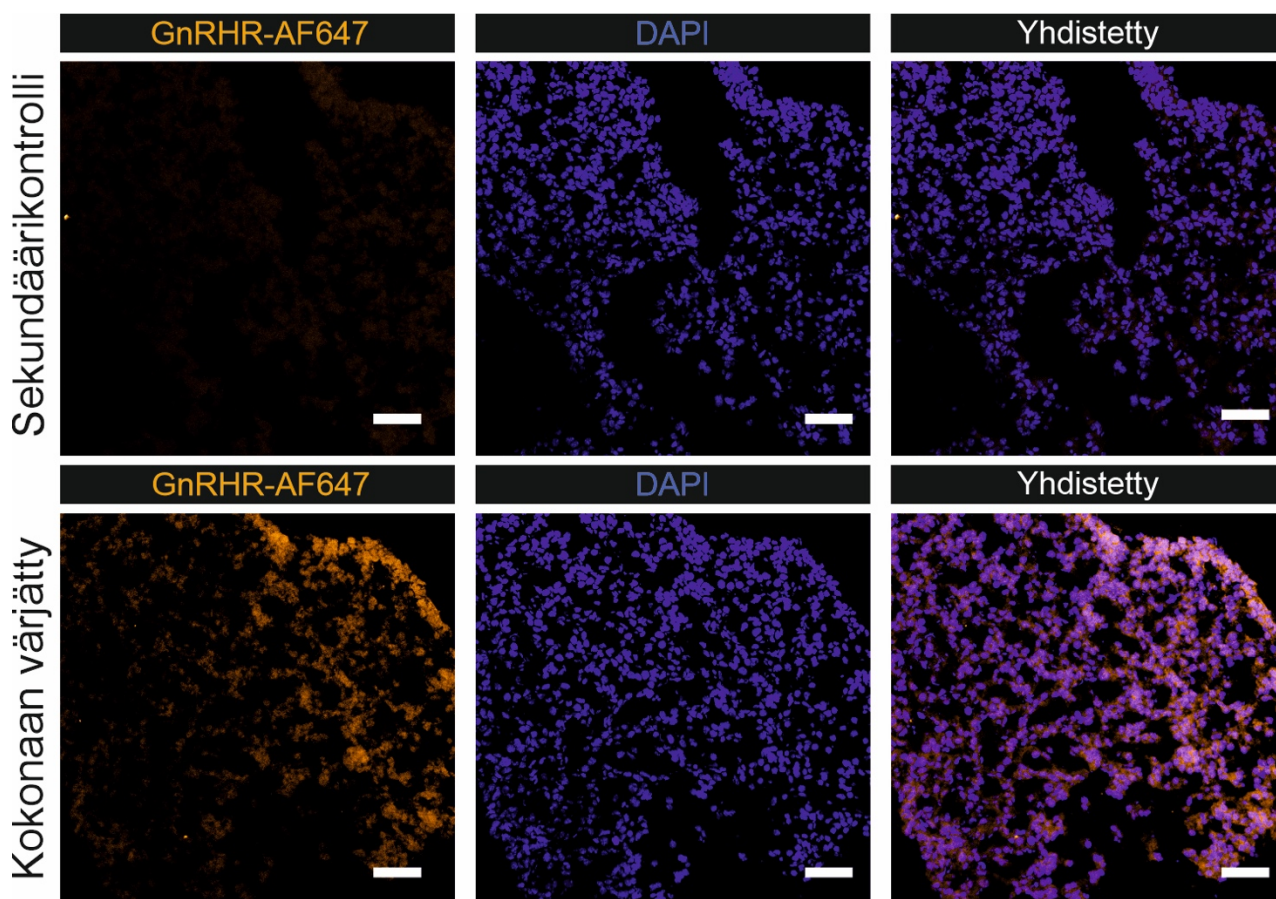


**Kuva 4. GnRHR-primäärivasta-aineen toimivuuden testaaminen fluorokromikonjugoidun AF488-sekundäärivasta-aineen kanssa** 9-viikkoisen uroshiiren aivolisäke GnRHR-primäärivasta-aineella, AF488-konjugoidulla sekundäärivasta-aineella (vihreä) ja nukleaarisella DAPI-väriaineella (sininen) värjätynä. Ylemmällä rivillä on sekundaarikontrolli, jonka värjäyksessä ei olla käytetty GnRHR-primäärivasta-ainetta. Alemmalla rivillä on kokonaan värjätty kudosleike, jonka värjäämisessä on käytetty GnRHR-primäärivasta-ainetta. Valkoinen palkki mittakaavana, 50 µm, kaikki leikkeet ovat 5 µm:n paksuisia. Kuvat otettiin konfokaalimikroskoopilla 20x-objektiivilla ilman immersiota.



**Kuva 5. GnRHR-primäriverstoffsaktiviteetin testaaminen fluorokromikonjugoidun AF546- sekundäriverstoffsaktiviteetin kanssa.** 5-viikkoisen uroshiiren aivolisäke GnRHR-primäriverstoffsaktiviteetillä, AF546-konjugoidulla sekundäriverstoffsaktiviteetillä (punainen) ja nukleaarisella DAPI-väriaineella (sininen) värjättyinä. Ylemmällä rivillä on sekundärkontrolli, jonka värjäyksessä ei olla käytetty GnRHR-primäriverstoffsaktiviteettiä. Alemmällä rivillä on kokonaan värjätty kudosleike, jonka värjämisessä on käytetty GnRHR-primäriverstoffsaktiviteettiä. Valkoinen palkki mittakaavana, 50  $\mu\text{m}$ , kaikki leikkeet ovat 5  $\mu\text{m}$ :n paksuisia. Kuvat otettiin konfokaalimikroskoopilla 20x-objektiveilla ilman immersiota.

Kokeita päätettiin siis jatkaa fluorokromikonjugoidulla AF546-sekundäriverstoffsaktiviteetillä ja seuraava koe tehtiin AF546-fluorokromikonjugoidulla sekundäriverstoffsaktiviteetillä. Näin meneteltiin, sillä AF488-fluorokromikonjugoitu sekundäriverstoffsaktiviteetti on jo optimoitu ryhmässä, jossa tutkielma tehtiin, käytettäväksi LH-primäriverstoffsaktiviteetin kanssa jääleikevärjäyksissä, joita tehtiin seuraavassa vaiheessa (Lehtonen ja muut 2025).

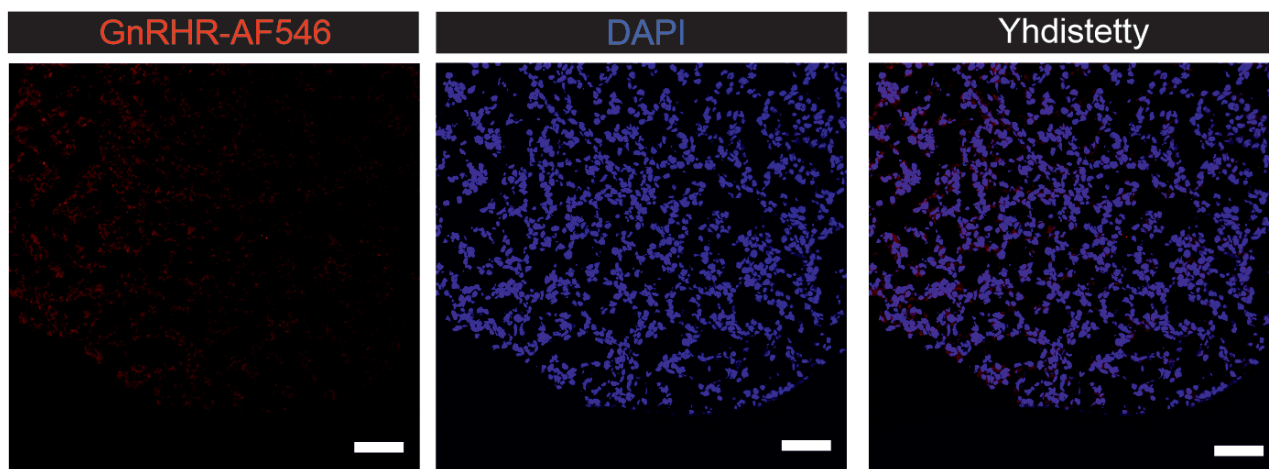


**Kuva 6. GnRHR-primäriverstanzaineen toimivuuden testaaminen fluorokromikonjugoidun AF647-sekundäriverstanzaineen kanssa.** 5- ja 9-viikkoisten uroshiirten aivolisäkkeet GnRHR-primäriverstanzaineella, AF647-konjugoidulla sekundäriverstanzaineella (oranssi) ja nukleaarisella DAPI-väriaineella (sininen) värjättyinä. Ylemmällä rivillä on sekundäriverstanzainekontrolli (9-viikkoinen hiiri), jossa ei ole käytetty GnRHR-primäriverstanzainetta. Alemmalla rivillä (5-viikkoinen hiiri) on kokonaan värjätty kudosleike, jossa on käytetty GnRHR-primäriverstanzainetta. Valkoinen palkki mittakaavana, 50  $\mu\text{m}$ , kaikki leikkeet ovat 5  $\mu\text{m}$ :n paksuisia. Kuvat otettiin konfokaalimikroskoopilla 20x-objektiivilla ilman immersiota.

Seuraavaksi tehtiin jääleikevärjaukset GnRHR- ja LH-primäriverstanzaineilla, jotta voitiin varmistua GnRHR:n oikeasta lokalisaatiosta ja optimoida AF546-fluorokromikonjugoidusta sekundäriverstanzaineesta johtuvaa taustasignaalia käyttämällä uutta laimennosta GnRHR-primäriverstanzaineelle (1:500-laimennoksesta 1:1000-laimennokseen). Gonadotrofit ilmentävät GnRH-reseptoria (GnRHR) ja sisältävät LH:ta, eli näitä kahta markkeria värjäämällä pystyttiin osoittamaan gonadotrofit. LH-primäriverstanzaineella on jo ryhmässä, jossa tutkielma tehtiin, tehty samanlaisia värjauksia kuin tässä tutkielmassa, eli sen tiedetään osoittavan gonadotrofit aivolisäkkeestä tehdyissä jääleikkeissä (Lehtonen ja muut 2025). GnRHR-signaalin näkyessä suunnilleen samoissa kohdissa ja saman verran kuin LH-signaalia, voidaan todeta GnRHR-primäriverstanzaineen myös osoittavan gonadotrofit aivolisäkkeestä.

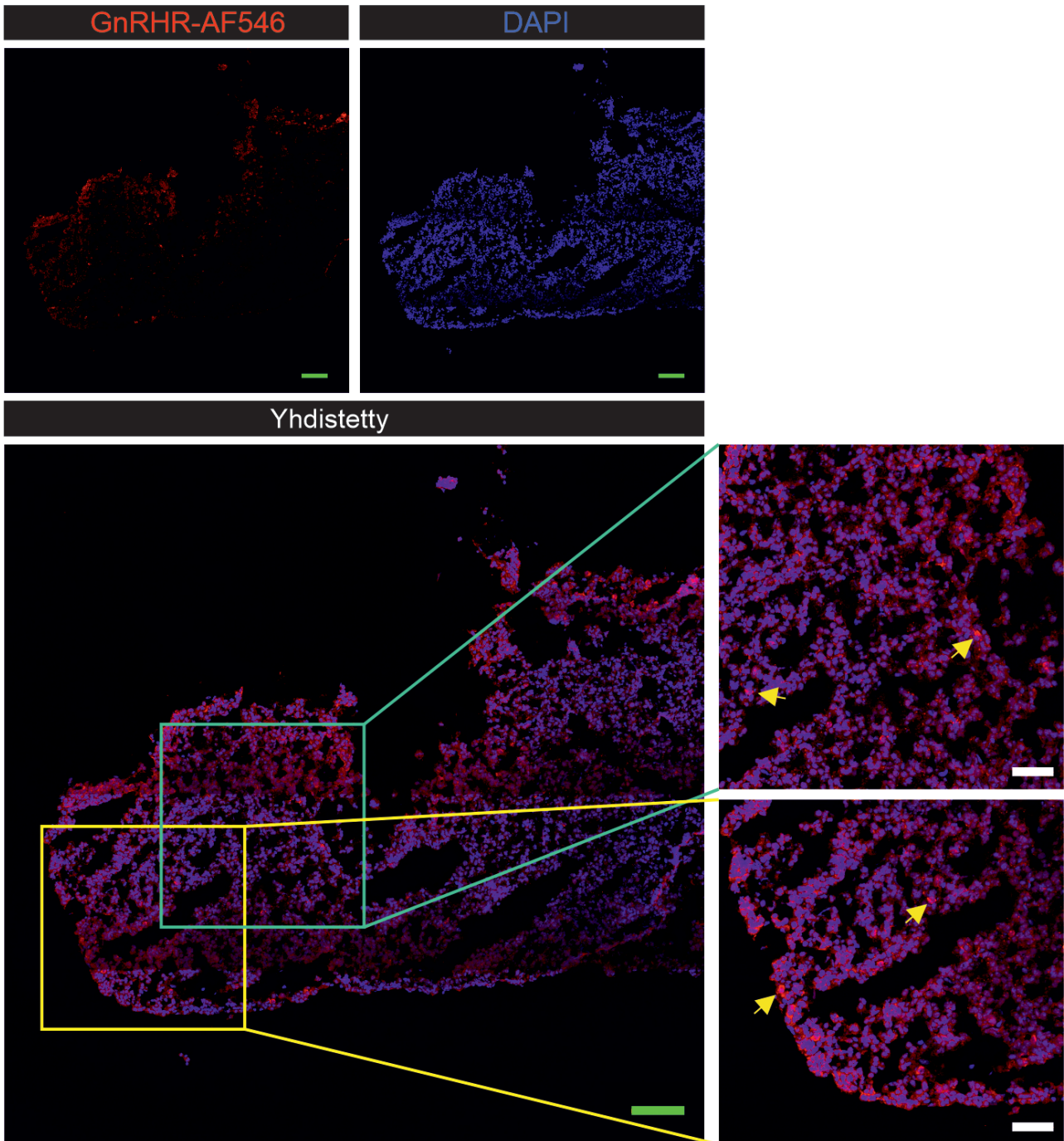
Tehtiin sekundäriverstanzaineliivärjaukset kudosleikkeille AF546-fluorokromikonjugoidulla sekundäriverstanzaineella, jonka taustasignaali on hyvin himmeä, mistä tiedettiin uuden 1:1000-

laimennoksen toimineen paremmin kuin edellisessä värjäyksessä käytetyn 1:500-laimennoksen (kuva 7).

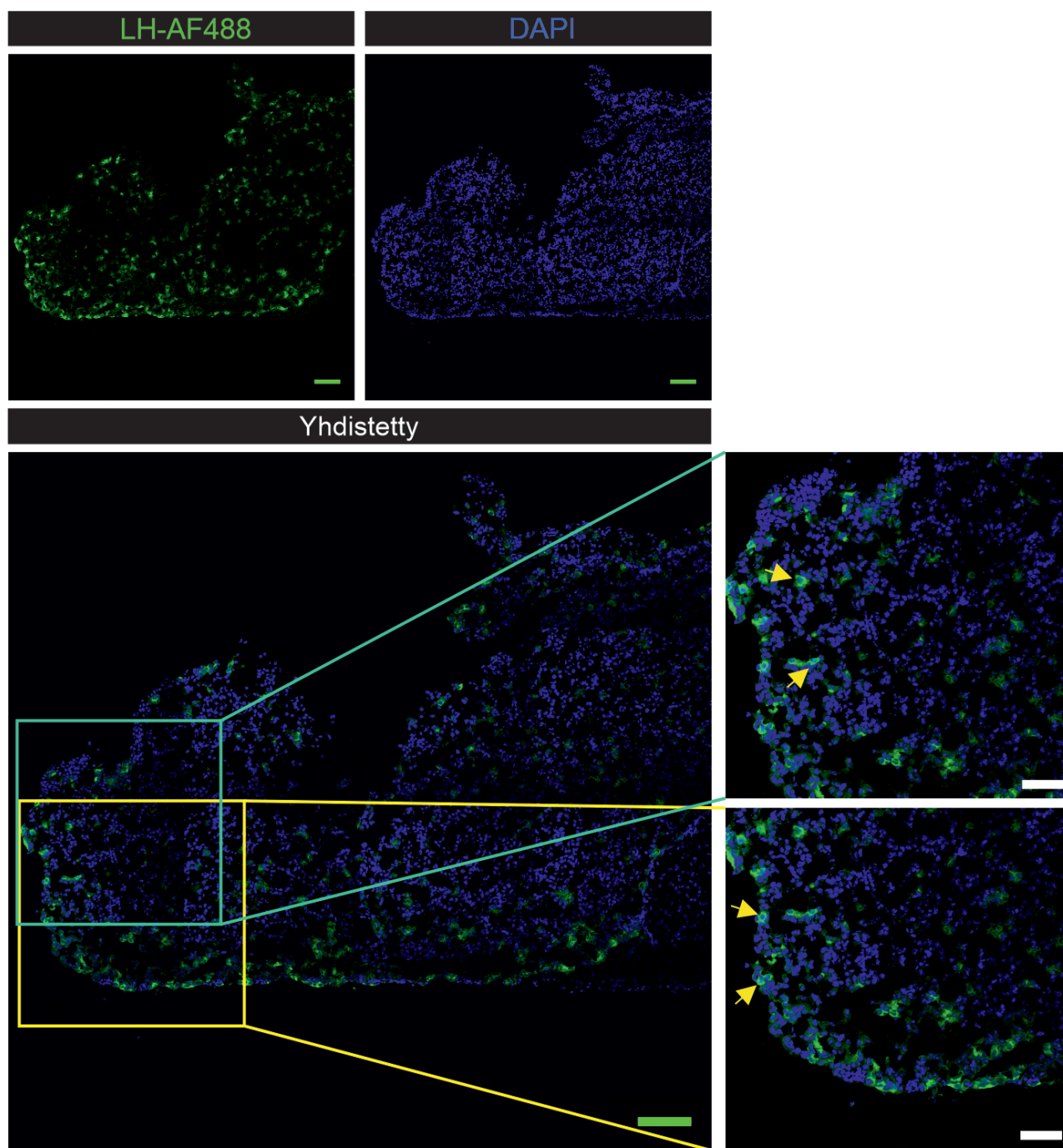


**Kuva 7. GnRHR-AF546 sekundäärikontrollinäyte 9-viikkoisen uroshiiren aivolisäkkeestä tehdyllä jääleikkeellä.** AF546-fluorokromikonjugoidulla sekundäärivasta-aineella (punainen) ja nukleaarisella DAPI-väriaineella (sininen) värjätty 9-viikkoisen uroshiiren jääleike. Valkoinen palkki on 50  $\mu\text{m}$ :n mittakaava. Näyteleike on 5  $\mu\text{m}$ :n paksuinen. Kuvat otettiin konfokaalimikroskoopilla 20x-objektiivilla ilman immersiota.

GnRHR-AF546-vasta-aineeparilla tehtiin myös kudosleikevärjäys uudella GnRHR-primäärivasta-aineen laimennoksella, 1:1000, jolla saavutettiin himmeämpi AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen taustasignaali ja siten erotettiin yksittäiset gonadotrofit paremmin (kuva 8). GnRHR- ja LH-primäärivasta-aineiden lokalisaatioiden perusteella voitiin päätellä GnRHR-primäärivasta-aineen kiinnittyneen juuri gonadotrofeihin eikä epäspesifisesti muihin solutyyppeihin (kuvat 8 ja 9), sillä GnRHR-AF546-signaalia (kuva 8) näkyi juurikin näyteleikkeen reuna-alueilla eniten ja samankaltaisissa määrin kuin LH-AF488-signaalia (kuva 9). Gonadotrofien tiedetään sijoittuvan kaikkialle aivolisäkkeen etulohkossa ja Pia Rantakaran ryhmässä aikaisemmin tehtyjen kokeiden perusteella niiden on huomattu sijoittuvan hieman enemmän etulohkon alaosiin, erityisesti reunoille (Lehtonen ja muut 2025). Kuvissa 8 ja 9 nähdään GnRHR- ja LH- positiivisten solujen sijoittuvankin voimakkaimmin juuri etulohkon reuna-alueille.



**Kuva 8. GnRH-reseptoria ilmentävien solujen osoittaminen 9-viikkoisen uroshiiren aivolisäkkeistä tehdyiltä jääleikkeiltä.** GnRHR-primäärivasta-aineella ja AF546-fluorokromikonjugoidulla sekundäärivasta-aineella värjätty jääleike. AF546-signaali näkyy punaisena, keltaiset nuolet osoittavat GnRHR-positiivisiin soluihin. Valkoinen palkki on 50  $\mu\text{m}$ :n mittakaava ja vihreä palkki on 100  $\mu\text{m}$ :n mittakaava. GnRHR ja DAPI-yksittäiskuvissa vihreät palkit. Kaikissa kuvissa on käytetty nukleaarista väriainetta DAPI (sininen) osoittamaan tumat. Näyteleike on 5  $\mu\text{m}$ :n paksuinen. Kuvat otettiin konfokaalimikroskoopilla 25x- ja 20x-objektiveilla glyseroli-immersiossa ja ilman immersiota.



**Kuva 9. GnRH-reseptoria ilmentävien ja luteinisoivaa hormonia sisältävien solujen osoittaminen 9-viikkoisen hiiren aivolisäkkeestä tehdyiltä jääleikkeiltä.** LH-primäärivasta-aineella ja AF488-sekondäärivasta-aineella (vihreä) värjätty näyte. Keltaiset nuolet osoittavat LH-positiivisiin soluihin Valkoinen palkki on 50  $\mu\text{m}$ :n mittakaava ja vihreä palkki on 100  $\mu\text{m}$ :n mittakaava. LH ja DAPI-yksittäiskuvissa vihreät palkit. Kaikissa kuvissa on käytetty nukleaarista markkeria DAPI (sininen) osoittamaan tumat. Näyteleike on 5  $\mu\text{m}$ :n paksuinen. Kuvat otettiin konfokaalimikroskoopilla 25x- ja 20x-objektiveilla glyseroli-immersiossa ja ilman immersiota.

### 3.1.2. GnRHR-primäärivasta-aine toimii AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa fenotyypittävissä virtausytometrisessä analyysissä

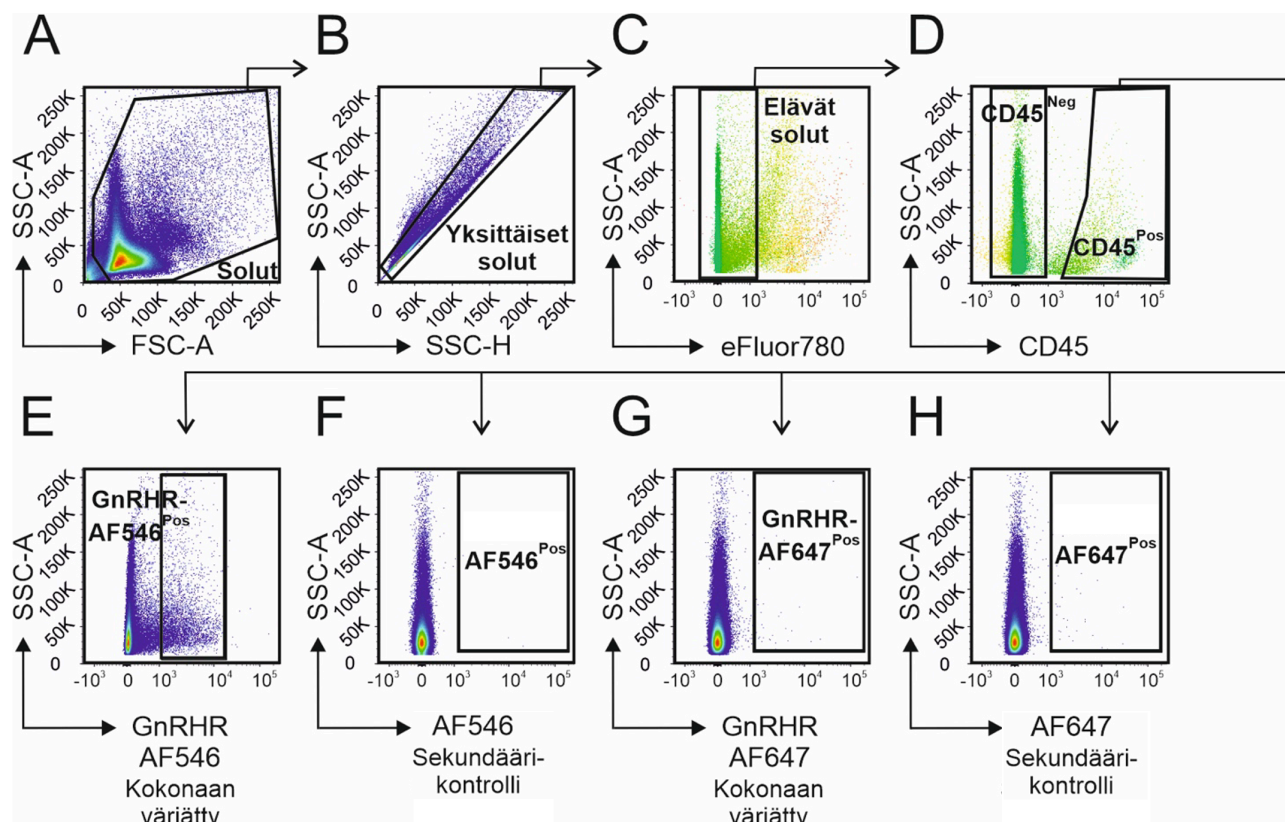
Virtausytometrian avulla voidaan fenotyypittää soluja käyttäen fluorokromikonjugoituja vasta-aineita. GnRHR-primäärivasta-aine, kuten muutkaan primäärivasta-aineet, ei ole fluorokromikonjogoitu, joten se tulee konjugoita fluorokromin sisältävällä sekundäärivasta-aineella. Ryhmässä aikaisemmin aivolisäkkeen makrofagien virtausytometriselle fenotyypittämiseksi suunniteltu vasta-ainepaneeli toimi kokeiden pohjana ja sen perusteella sekundäärivasta-ainevaihtoehdoiksi jäivät AF546- ja AF647-fluorokromikonjugoidut sekundäärivasta-aineet.

Työn ensimmäisenä vaiheena aivolisäkkeille tehtiin virtausytometrinen analyysi, jotta voitiin varmistua GnRHR-primäärivasta-aineen toimivuudesta joko AF546- tai AF647-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa. Toimivuudesta haluttiin varmistua virtausytometrisessä analyysissä, sillä virtausytometriavusteisessa solujen lajittelussa voidaan käyttää samaa primääri-sekundäärivasta-aineparia aivolisäkkeen makrofagien ja gonadotrofin lajittelemiseksi ATP-mittauksia varten. Virtausytometrian avulla solu- tai kudospäätteestä voidaan fluorokromiavusteisesti tunnistaa tiettyjä soluja.

Virtausytometria-ajon jälkeen tulokset analysoitiin FlowJo-ohjelmalla siten, että ensin kaikista havaituista soluista rajattiin soludebris pois (kuva 10A), minkä jälkeen toisiinsa takertuneet solut rajattiin pois (kuva 10B). Seuraavaksi yksittäisistä soluista eroteltiin eläväsolumarkkerin perusteella kuolleet ja elävät solut toisistaan (kuva 10C) ja elävistä soluista eroteltiin CD45-positiiviset ja -negatiiviset solut (kuva 10D).

Kokonaan värjättyssä AF546-näytteessä nähdään GnRHR-positiivisia soluja (kuva 10E), kun taas AF546-sekundäärikontrollinäytteessä niitä ei nähdä (kuva 10F). Kokonaan värjättyssä AF647-näytteessä (kuva 10G) kuin AF647-sekundäärikontrollinäytteessäkin (kuva 10H) ei sen sijaan nähdä juuri lainkaan GnRHR-positiivisia soluja. Nähdään myös, että kummankin fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen sekundäärikontrollinäytteissä ei ole autofluoresenssista johtuvaa taustasignaalia, jolloin voidaan todeta kokonaan värjätyn näytteen tuloksen olevan luotettava. AF546-fluorokromikonjogoitu sekundäärivasta-aine (kuva 10E ja F) toimii siis paremmin GnRHR-primäärivasta-aineen kanssa verrattuna AF647-fluorokromikonjogoituu sekundäärivasta-aineeseen (kuva 10G ja H). Tämän tuloksen perusteella

kaikki tutkielman muut virtausytometri- ja solulajittelunäytteet värjättiin AF546-konjugoitua sekundäärivasta-ainetta käyttäen.



**Kuva 10. Virtausytometrinen analyysimalli FlowJo-ohjelmalla tehtynä.** (A) Soludebriin rajaaminen soluista, (B) yksittäisten solujen rajaaminen toisiinsa tarttuneista soluista, (C) elävien solujen rajaaminen kuolleista soluista, (D) lymfosyyttien rajaaminen muista soluista. (E) GnRHR-primäri- ja AF546-sekundääri-ainetilla värjätty elävät solut, (F) AF546-sekundäärikontrollinäyte, joka on värjätty vain AF546-sekundääri-ainetilla ilman GnRHR-primäri-ainetta. (G) GnRHR-primäri- ja AF647-sekundääri-ainetilla värjätty elävät solut, (H) AF647-sekundäärikontrollinäyte, joka on värjätty vain AF647-sekundääri-ainetilla ilman GnRHR-primäri-ainetta.

### 3.2. Aivolisäkkeessä on GnRHR-positiivisten makrofagien alapopulaatio

Vatsakalvon makrofagien on osoitettu ilmentävän GnRH-reseptoria pinnallaan (Min ja muut 2009). Haluttiinkin selvittää, ilmentävätkö myös pitMØ-solut GnRH-reseptoria pinnallaan, mikä osittain valottaisi niiden roolia gonadotrofin hormonitoiminnan säätelyssä. Tätä varten hyödynnettiin virtausytometrinen analyysi, jonka avulla voitiin erottaa toisistaan eri solupopulaatiot ja niiden alapopulaatioita.

#### 3.2.1. Aivolisäkkeen GnRHR-positiiviset pitMØ-solut ja gonadotrofit kyetään

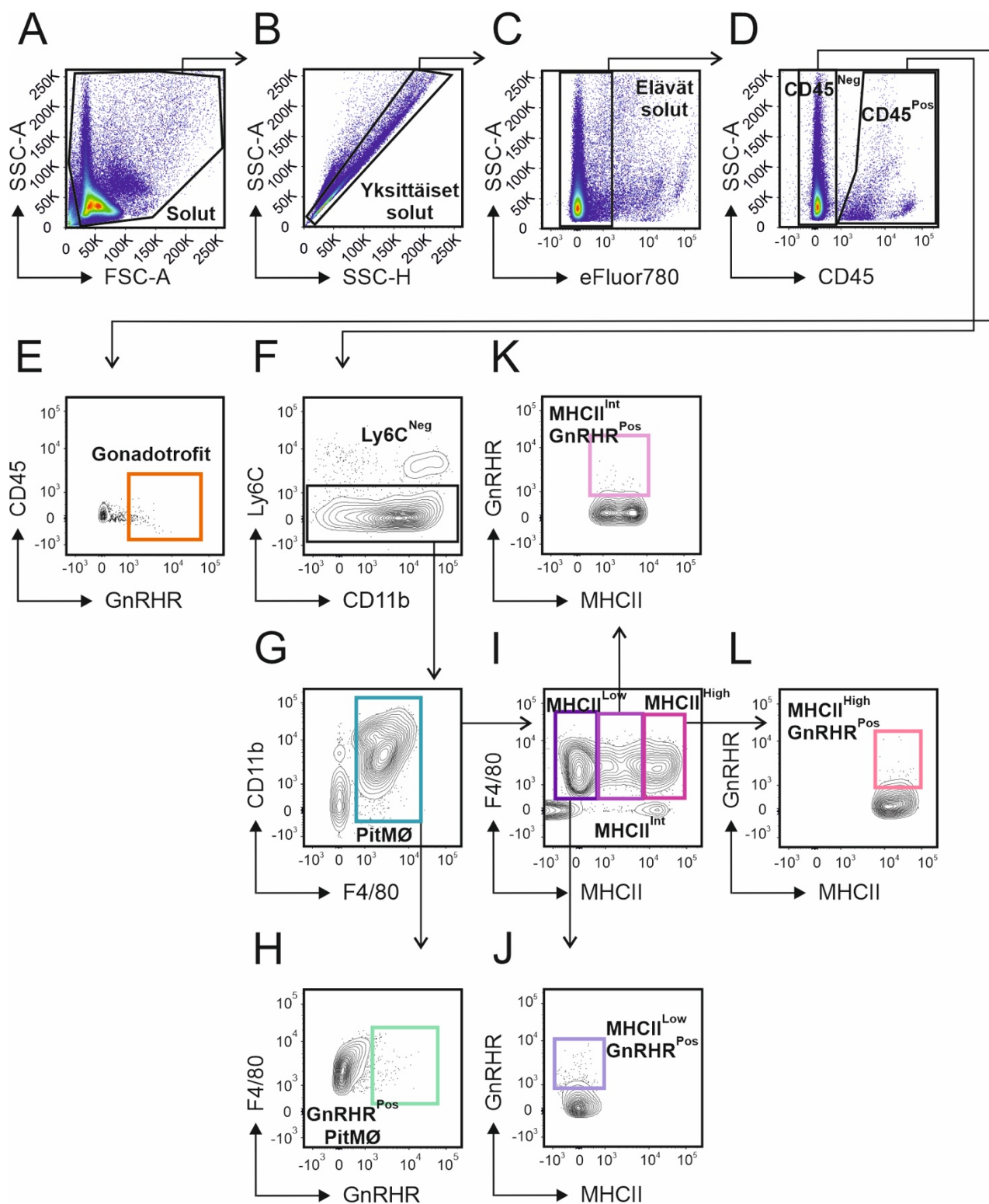
osoittamaan aivolisäkkeestä fenotyypittävällä virtausytometrisellä analyysillä

Aivolisäkkeen etulohkosta osoitettiin gonadotrofin ja makrofagien solupopulaatiot virtausytometrisellä analyysillä. Populaatioiden osoittamiseen käytettiin seuraavanlaista virtausytometrisen analyysin mallia (Kuva 11): kaikista soludebriiksestä rajatuista soluista (kuva

11A) eroteltiin toisiinsa tarttuneista soluista yksittäiset solut (kuva 11B), joista eroteltiin elävät solut kuolleista eläväsolumarkkerin avulla (kuva 11C). Elävistä soluista erotettiin kaksi populaatiota (kuva 11D), immuunisolumarkkerille CD45:lle positiiviset ja negatiiviset solut. CD45<sup>-</sup>-soluista erotettiin GnRHR<sup>+</sup>-yksittäispositiiviset solut (kuva 11E).

CD45<sup>+</sup> soluista erotettiin monosyyttimarkkeri Ly6C:lle negatiiviset ja myeloidisolumarkkeri CD11b:lle positiiviset solut (kuva 11F). Näin meneteltiin, sillä aivolisäkkeen makrofagien tiedetään olevan peräisin ruskuaispussista (Lehtonen ja muut 2025), eivätkä ne siis ole positiivisia Ly6C:lle, jota luuydinperäiset makrofagit ilmentävät.

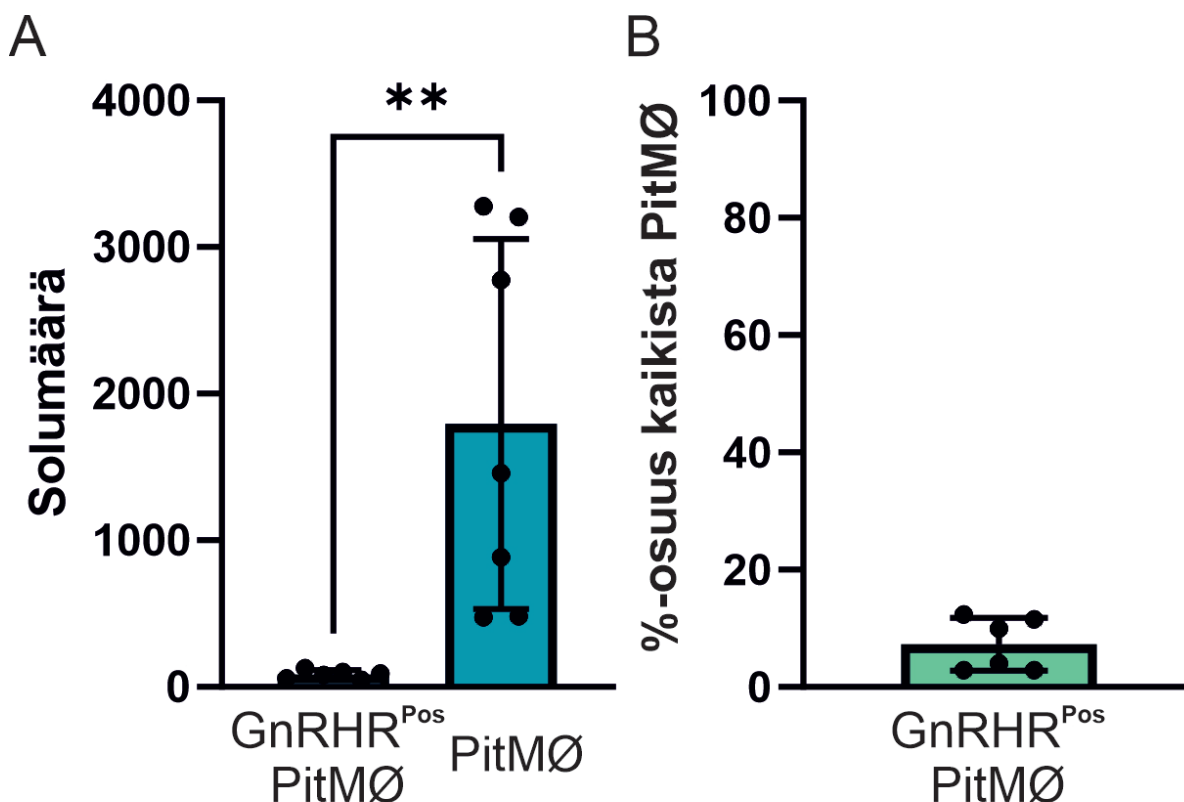
Seuraavaksi rajattiin kaikki aivolisäkkeen makrofagit CD11b:n ja F4/80:n perusteella (kuva 11G). Tästä populaatiosta saatiin kolme MHC II-markkerin ilmentämistasoon perustuvaa solupopulaatiota (kuva 11H) ja kaikki pitMØ GnRHR-positiiviset solut (kuva 11I). MHCII-reseptorin ilmentämistason perusteella jaotellut GnRHR-positiiviset makrofagipopulaatiot olivat GnRHR<sup>+</sup> ja MHCII<sup>low</sup> (kuva 11J), GnRHR<sup>+</sup> ja MHCII<sup>int</sup> (kuva 11K) sekä GnRHR<sup>+</sup> ja MHCII<sup>high</sup> (kuva 11L). Kaikissa MHCII:n ilmentymiseen perustuvissa populaatioissa GnRHR:n ilmentyminen oli selkeää, mikä osoittaa myös mahdollisesti useamman aivolisäkkeen makrofagipopulaation ilmentävän kyseistä reseptoria.



**Kuva 11. Virtausytometrisen analyysiprosessin malli gonadotrofien ja makrofagien osoittamiseksi hiiren aivolisäkkeestä FlowJo-ohjelmalla tehtynä. PitMØ tarkoittaa aivolisäkkeen kaikkia makrofageja. (A) Solujen rajaaminen soludebriksestä, (B) yksittäisten solujen rajaaminen kaikista soluista, (C) elävien solujen rajaaminen elävsolumarkkerin perusteella, (D) lymfosyyttien rajaaminen muista soluista, (E) gonadotrofien rajaaminen lymfosyyteistä, (F) ruskuaispussiperäisten Ly6C-negatiivisten solujen rajaaminen luuydinperäisistä Ly6C-positiivisista soluista, (G) pitMØ-solujen rajaaminen ruskuaispussiperäisistä CD11b-positiivisista soluista, (H) GnRHR-positiivisten pitMØ-solujen rajaaminen kaikista pitMØ-soluista, (I) MHCII-reseptorin ilmentymistason perusteella kolmen makrofagialapopulaatioiden rajaaminen toisistaan, (J) MHCII-reseptoria matalasti ilmentävät GnRHR-positiiviset pitMØ-solut, (K) MHCII-reseptoria keskitasoisesti**

ilmentävät GnRHR-positiiviset pitMØ-solut, (L) MHCII-reseptoria korkeasti ilmentävät GnRHR-positiiviset pitMØ-solut.

Virtaussytometrisen analyysin perusteella lasketusta pitMØ-solujen kokonaismäärästä GnRHR-positiivisten pitMØ-solujen määrä on populaation kokoon verrattuna tilastollisesti merkittävästi alhaisempi (kuva 12A), noin 7 % pitMØ-solujen populaatiosta (kuva 12B).



**Kuva 12. GnRHR-positiivisten pitMØ-solujen määrän vertaileminen pitMØ-solujen kokonaismäärään.** (A) GnRHR-positiivisten pitMØ-solujen määrä verrattuna kaikkien pitMØ-solujen määrään, GnRHR-positiivisia pitMØ-soluja on huomattavasti vähemmän. (B) GnRHR-positiivisten pitMØ-solujen prosentiosuus kaikista pitMØ-soluista. \*\* $p < 0.01$  Tilastollista merkittävyyttä mitattiin parittomalla T-testillä. Jokainen piste edustaa yhtä aivolisäkettä.

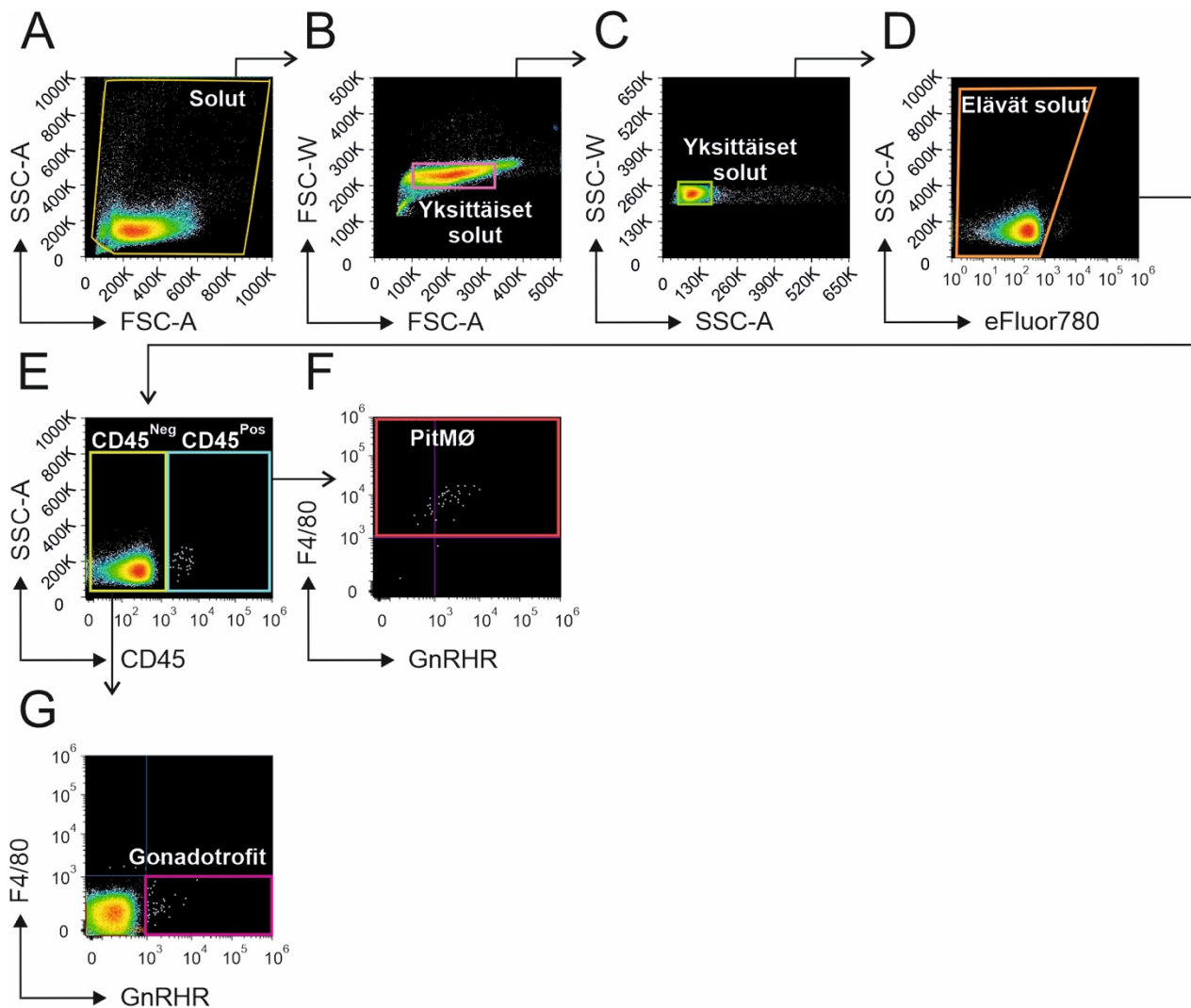
### 3.3. Aivolisäkkeen makrofageja ja gonadotrofeja kyetään lajittelemaan virtaussytometrialla

Lajittelevalla virtaussytometrialla voidaan lajitella soluja niiden pintareseptorien perusteella siten, että lajiteltuja soluja voidaan jälkepäin käyttää muihin koejärjestelyihin. Tässä tutkielmassa haluttiin lajitella aivolisäkkeestä pitMØ-solut ja gonadotrofit, jotta niitä voitiin tutkielman myöhemmässä vaiheessa käyttää ATP-konsentraatioiden mittaamiseen soluviljelmästä.

#### 3.3.1. Analyysimallit virtaussytometrisille solulajittelijoille

PitMØ-solut ja gonadotrofit rajattiin muista soluista, jotta vain nämä kaksi populaatiota saatiin lajiteltua talteen. SONY SH800 -solulajittelijalla analyysimalli oli seuraavanlainen: ensin solut

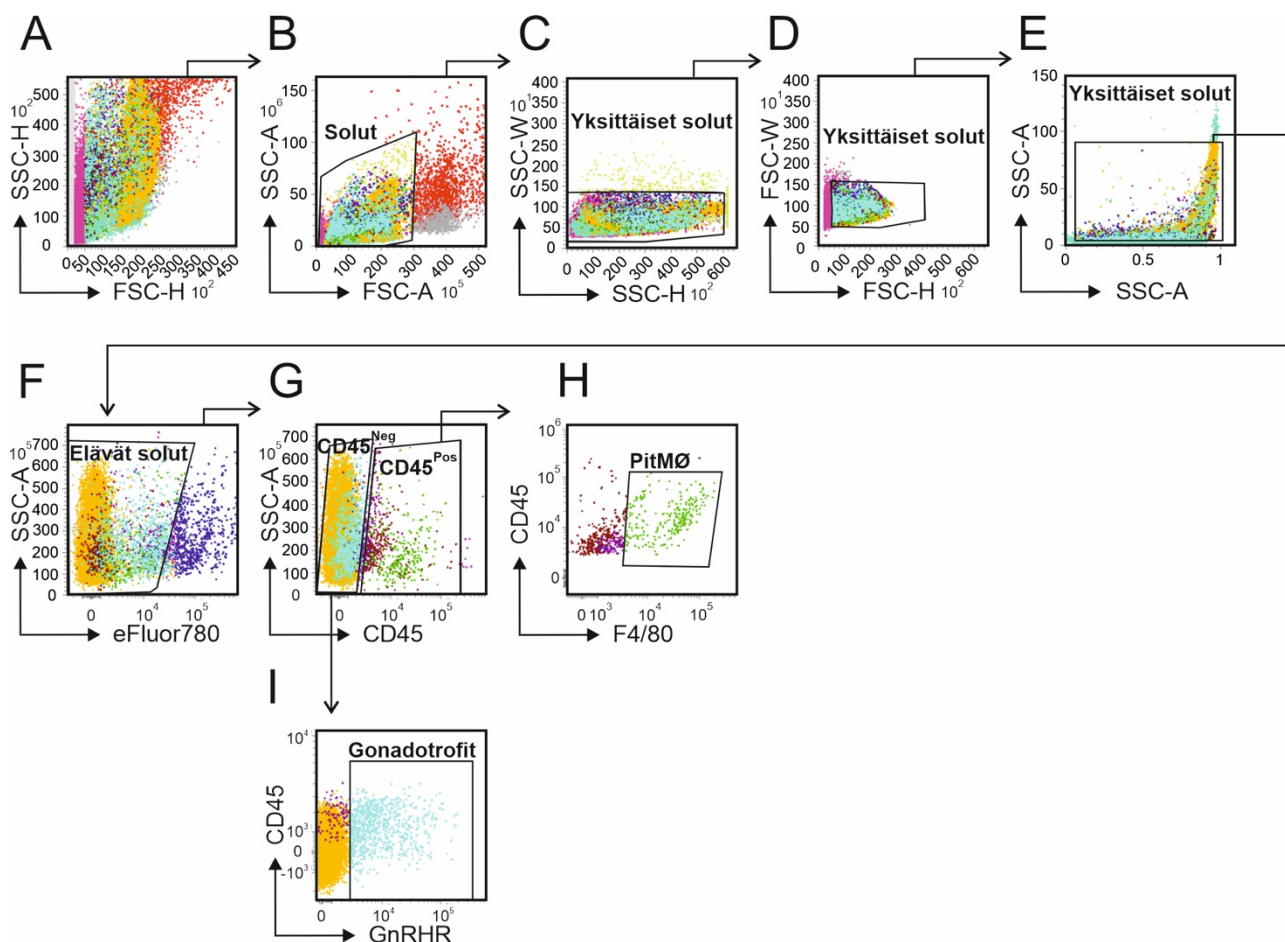
rajattiin soludebriksestä (kuva 13A), joista erotettiin yksittäiset solut (kuva 13B ja C). Yksittäisistä soluista erotettiin elävät solut, joista erotettiin CD45-positiiviset ja -negatiiviset solut (kuva 13D). Lopulta erotettiin kaksi talteen kerättävää solupopulaatiota: CD45 positiivisista soluista F4/80-positiiviset solut (kuva 13E; aivolisäkkeen makrofagit, pitMØ) ja CD45-negatiivisista soluista GnRHR-positiiviset ja F4/80-negatiiviset solut (kuva 13F; gonadotrofit).



**Kuva 13. SONY SH800 -solulajittelijalle tehty virtausytometrinen analyysimalli aivolisäkkeen makrofagien ja gonadotrofiin fluoresenssiavusteiseen lajitteluun.** PitMØ tarkoittaa aivolisäkkeen kaikkia makrofageja. (A) Solujen rajaaminen soludebriksestä, (B ja C) toisiinsa takertuneiden solujen rajaaminen yksittäisistä soluista, (D) elävien solujen rajaaminen kulleista soluista, (E) CD45-positiivisten lymfosyyttien ja CD45-negatiivisten muiden solujen rajaaminen toisistaan, (F) F4/80-positiiviset pitMØ-solut, (G) GnRHR-positiiviset gonadotrofit.

BD S8 Discover-solulajittelijalla analyysimalli oli seuraava: Kaikista havaituista tapahtumista erotettiin solut soludebriksestä (14A ja B), minkä jälkeen yksittäiset solut rajattiin toisiinsa tarttuneista soluista (14C, D ja E) etu- ja sivusirontojen avulla. Yksittäisistä soluista rajattiin elävät solut eläväsolumarkkerin perusteella (14F ja K), minkä jälkeen elävistä soluista erotettiin CD45<sup>+</sup> ja

CD45<sup>-</sup> -populaatiot (14G ja L). CD45-negatiivisista soluista rajattiin GnRHR-positiiviset solut, eli gonadotrofit (14I ja N). CD45-positiivisista soluista rajattiin pitMØ-solut (14H ja M).

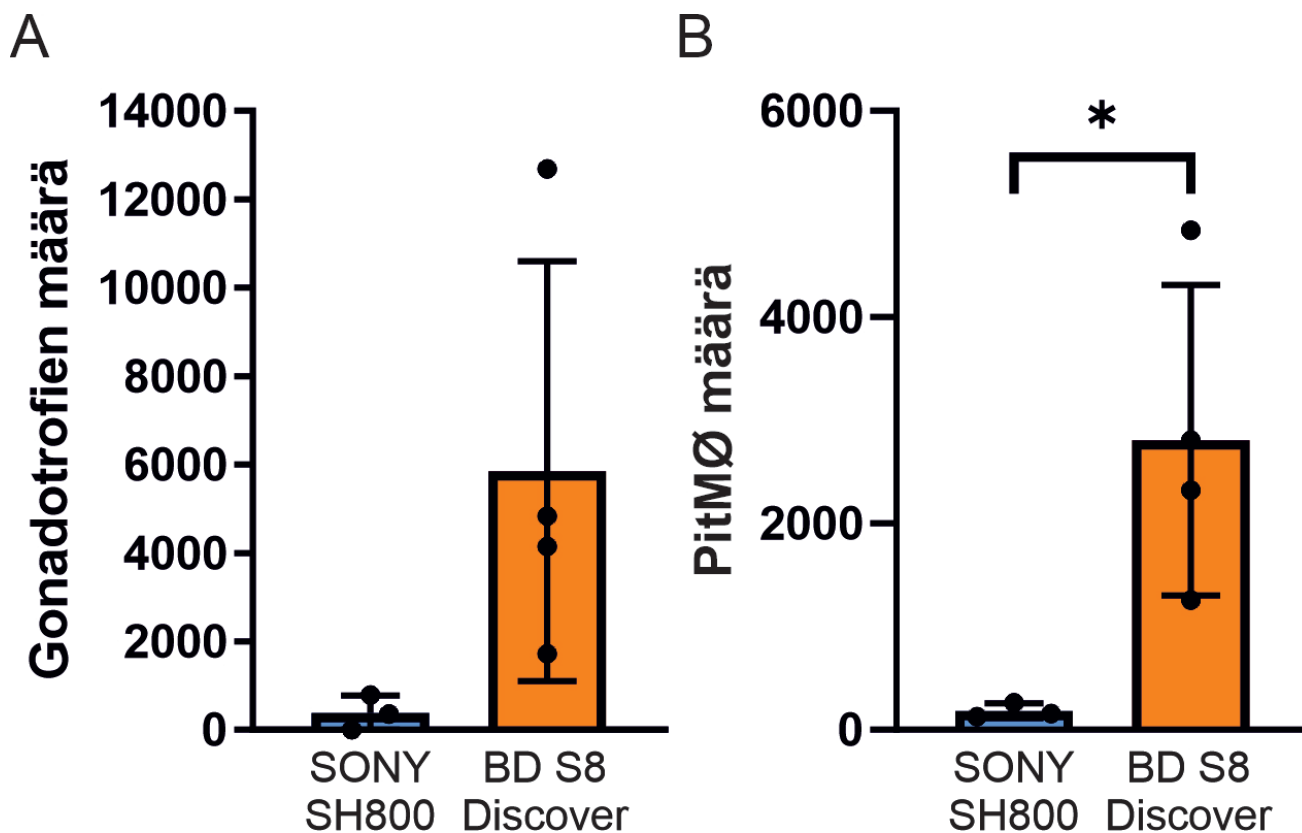


**Kuva 14. BD S8 Discover -solulajittelijalla tehty virtausytometrinen analyysimalli aivolisäkkeen makrofagien ja gonadotrofiin fluoresenssiavusteiseen lajitteluun.** (A) Kaikki havaitut tapahtumat, (B) solujen rajaaminen soludebriksistä, (C, D ja E) yksittäisten solujen rajaaminen toisiinsa takertuneista soluista, (F) elävien solujen rajaaminen kuolleista soluista, (G) CD45-positiivisten lymfosyyttien ja CD45-negatiivisten muiden solujen rajaaminen toisistaan, (H) F4/80-positiiviset pitMØ-solut, (I) GnRHR-positiiviset gonadotrofit.

### 3.3.2. SONY SH800 - ja BD S8 Discover -solulajittelijoilla pystytään lajittelemaan aivolisäkkeen gonadotrofeja ja pitMØ-soluja

Soluja lajiteltiin kahdella solulajittelijalla. Ensimmäiset solulajittelut tehtiin SONY SH800 -solulajittelijalla, jolla saatiin kerättyä talteen  $183,4 \pm 72,1$  pitMØ-solua ja  $380,6 \pm 390,6$  gonadotrofia. Koska saanto oli varsin matalaa kautta linjan SONY SH800 -lajittelijalla, lajitteluja siirryttiin tekemään BD S8 Discover -lajittelijalla. BD S8 Discover -solulajittelijalla saatiin kerättyä talteen  $2806 \pm 1504$  pitMØ-solua ja  $5848 \pm 4751$  gonadotrofia. Vertailtaessa näiltä kahdelta solulajittelijalta saatujen solujen saantoa, oli huomattavissa, että BD S8 Discover-solulajittelijalla saatiin kerättyä talteen keskimäärin enemmän kumpaakin solutyyppiä (kuva 15A ja B). PitMØ-soluja saatiin lajiteltua BD S8 Discover -lajittelijalla merkittävästi enemmän kuin SONY SH800 -

lajittelijalla (kuva 15B), kun taas gonadotrofiin saannossa ei ole tilastollisesti merkittävää eroa, vaikkakin kuvasta 15A voidaan huomata BD S8 Discover -lajittelijan saannon olevan korkeampaa kuin SONY SH800 -lajittelijan.



Kuva 15. Solujen saannon vertailu SONY SH800 - ja BD S8 Discover -solulajittelijoiden välillä. (A) Gonadotrofiin saannon vertailu SONY SH800 - ja BD Discover -solulajittelijoilla. (B) Aivolisäkkeen makrofagiin saannon vertailu SONY SH800 - ja BD S8 Discover -solulajittelijoilla. PitMØ tarkoittaa aivolisäkkeen kaikkia makrofageja. \* $p < 0.05$ . Jokainen piste vastaa yhtä aivolisäkettä.

### 3.4. GnRH-indusointi saa aikaan muutoksia gonadotrofiin ja pitMØ-solujen kasvatuksien ATP-konsentraatioissa

Vatsakalvon GnRHR-positiivissa makrofageissa tapahtuu solunsisäisen kalsiumin konsentraation nouseminen GnRH-stimulaation seurauksena (Min ja muut 2009). Kalsiumtasojen nouseminen makrofageissa saa aikaan ATP:n vapautumisen solun ulkopuolelle, jossa se voi esimerkiksi toimia muiden solujen aktivoijana (Zumerle ja muut 2019). Kalsium on myös gonadotrofiin GnRHR-signaaloinnissa tärkeässä osassa, edistäen gonadotrofiin hormonien tuotantoa ja eritystä. Kalsiumin toimintaan GnRHR-signaaloinnissa liittyy solun ulkopuolisen ATP:n konsentraatio, sillä ATP aktivoi osaa solukalvolla olevista kalsiumia sisäänpäästävistä kanavista. Näin ollen lajitellut solut jaettiin pitMØ-solujen ja gonadotrofiin yksittäis- ja yhteiskasvatuksiin, joista kerättiin mediuunäytteitä ATP-konsentraatioiden mittaamiseksi. Näin meneteltiin, jotta saatiin selvitettyä miten erilaiset ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyt vaikuttavat pitMØ-solujen ja gonadotrofiin yksittäis- ja

yhteiskasvatusten ATP:n konsentraatioihin. ATP:n konsentraatio osoittaa epäsuorasti, kuinka paljon kalsiumia soluihin otetaan sisään, mikä vuorostaan vaikuttaa gonadotrofin hormonien eritykseen.

Entsyymikytkennäisellä fluorometrisellä analyysillä pystytään mittaamaan mataliakin ATP-konsentraatioita luotettavasti myös solukasvatusten mediuumeista. Tämän koejärjestelyn tavoitteena oli testata ja lopuksi optimoida solukasvatuksista ATP-konsentraatioiden mittaaminen.

### 3.4.1. ATP-tasojen mittaamisen protokollan optimointiprosessi

Lajittelun jälkeen solut jaettiin lajitteluputkista 96-kuoppalevyjen kaivoihin. Lajittelusta saatujen solujen lukumäärästä laskettiin kaavan 1 osoittamalla tavalla, kuinka paljon soluja kaivoihin saataisiin. Kuhunkin kaivoon pyrittiin saamaan vähintään 5000 solua.

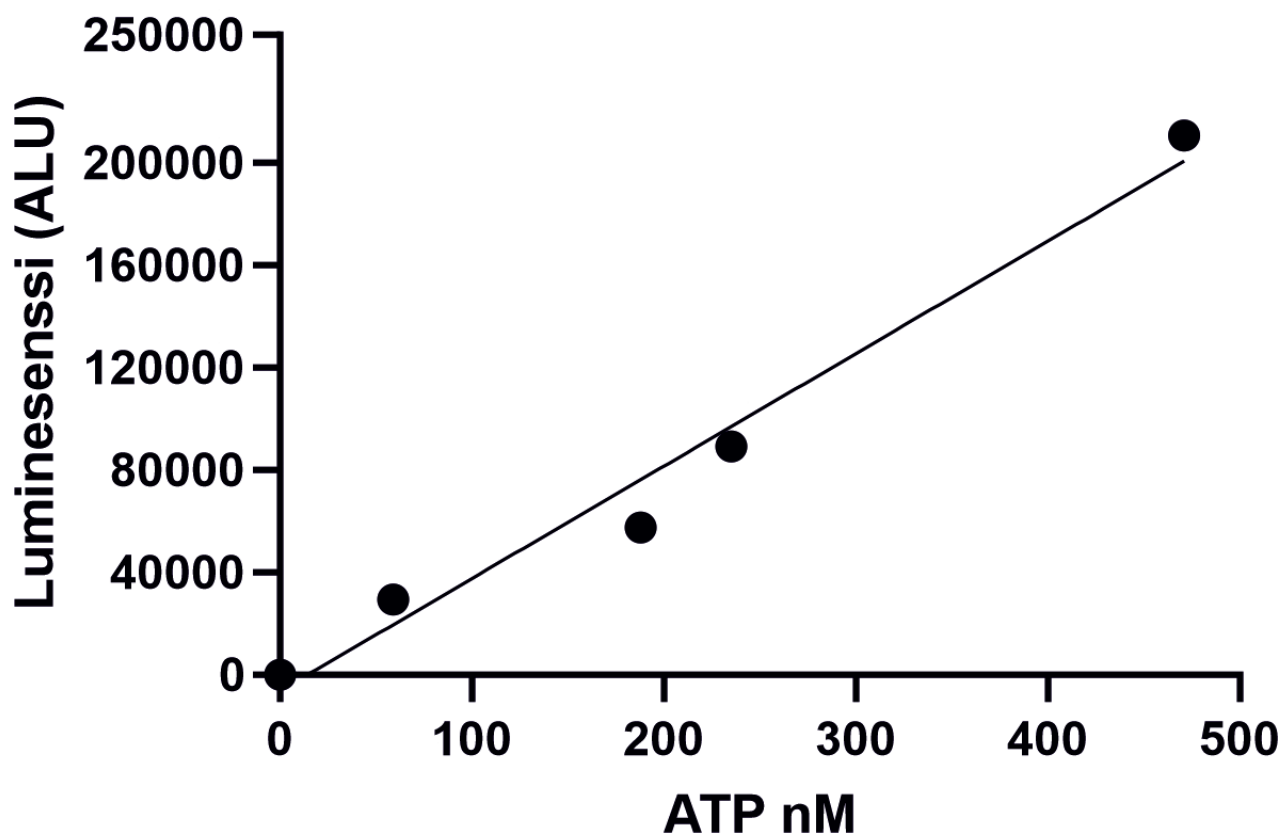
$$\frac{\text{Saatujen solujen määrä}}{\text{Kaivojen määrä}} = \text{Kuhunkin kaivoon tuleva solujen määrä} \quad (1)$$

Lajittelun päätteeksi, lajitteluputkista myös mitattiin niissä olleen mediumin tilavuus, minkä jälkeen voitiin laskea kuhunkin 96-kuoppalevyn kaivoon pipetoitavan mediumin tilavuus kaavan 2 osoittamalla tavalla.

$$\frac{\text{Tilavuus, jossa solut ovat lajittelun jälkeen}}{\text{Kaivojen määrä}} = \text{Jokaiseen kaivoon pipetoitu tilavuus} \quad (2)$$

Kasvatuslevyjen kaivoihin jaetuille soluille tehtiin (1.) ATP-, (2.) ATP- ja GnRH-, (3.) ATP- ja POM1-, (4.) GnRH- ja POM1-, (5.) ATP- ja GnRH- ja POM1- tai (6.) GnRH-käsittelyjä, jonka jälkeen kasvatuksissa olleen ATP:n konsentraatiota mitattiin. Ennen ATP:n konsentraation mittaamista ATPLite-kitille valmistettiin kalibraatio-suora (kuva 16), jonka avulla pystyttiin laskemaan näytteiden ATP:n konsentraatio.

## ATPLite kalibraatiosuora



Kuva 16. ATPLite-kalibraatiosuora ATP-mittauksia varten.

Luminesenssimittauksista saaduista arvoista laskettiin näytteissä olleen ATP:n konsentraatio nanomolaarisuutena (nM). Tätä varten tuli ensin laskea näytteiden taustasignaali ( $ATP' - BI$ ) kaavan 3 osoittamalla tavalla.

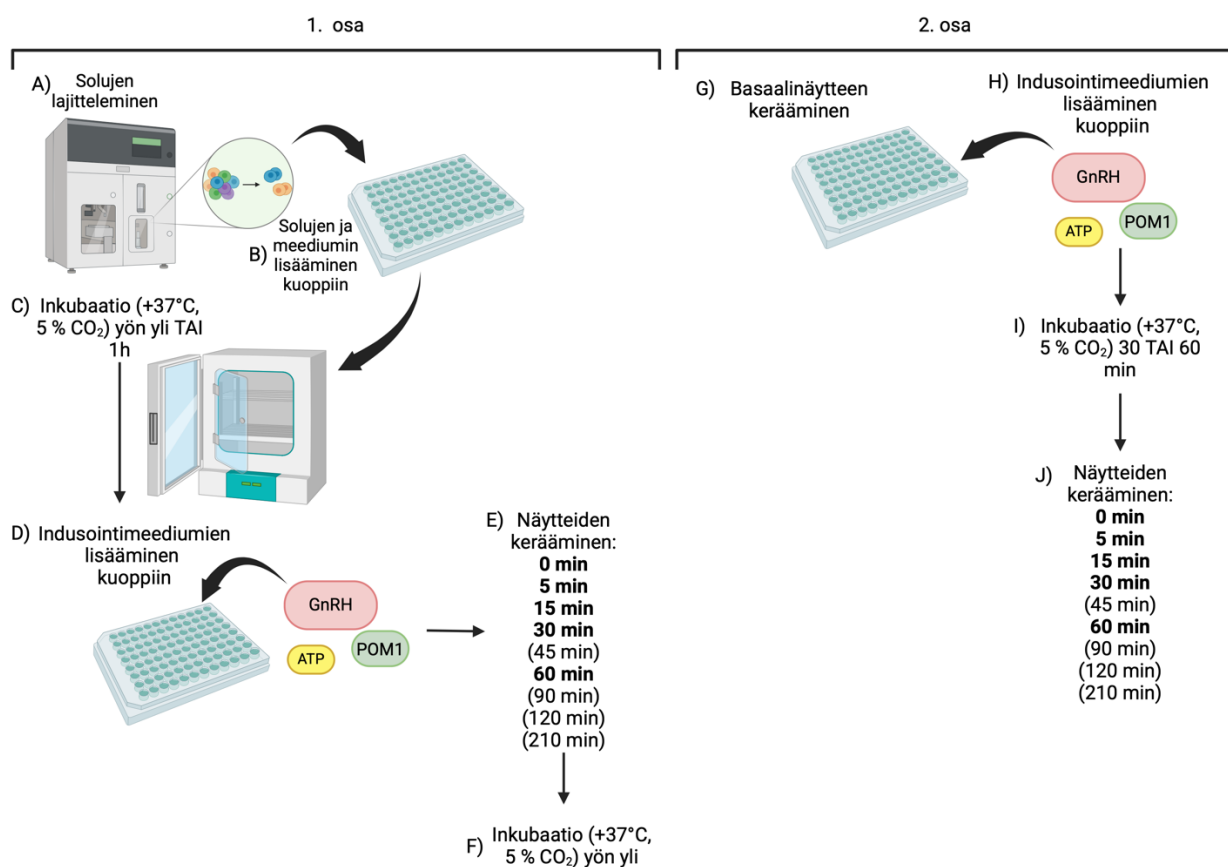
$$ATP' - BI = ATP: n \text{ mitattu määrä näytteessä} - 0 \text{ nM ATP standardinäyte} \quad (3)$$

Kaavan 4  $K$ -merkkintä merkitsee kuvan 15 kalibraatiosuorasta saatua kulmakerrointa.

$$nM = (ATP' - BI) \times \text{kaivossa ollut kokonaistilavuus} \times \frac{K}{\text{näytteen tilavuus}} \quad (4)$$

Kokeita, joissa ATP-tasoa mitattiin, tehtiin neljä kertaa, joista jokaisessa inkubaatioiden kestot, käytetyt indusointimediumit, näytteiden keräämisen aikapisteet ja solukasvatusten määrä vaihteli. Näitä muuttujia vaihdeltiin kokeiden välillä, sillä edellisen kokeen tulosten perusteella seuraavaa koetta pyrittiin aina optimoimaan. Kuvassa 16 on esitettyä ATP-kokeissa käytetty perusprotokolla, joka pysyi samana kaikissa kokeissa. Kokeen aloituspäivänä pitMØ-solut ja gonadotrofit lajiteltiin solulajittelijalla (kuva 17A), minkä jälkeen ne jaettiin kasvatustilavuuksien kuoppiin (kuva 17B) ja laitettiin inkubaattoriin lepäämään joko 30 minuutin ajaksi tai yön yli (kuva 17C).

Lepäämisinkubaation jälkeen soluja indusoiitiin erilaisilla GnRH:ta, ATP:tä ja POM1:tä sisältäneillä mediuumeilla (kuva 17D) ja indusoinnin jälkeen kasvatuksista kerättiin näytteitä eri aikapisteissä (kuva 17E). Näytteiden keräämisen jälkeen kasvatuslevyt laitettiin inkubaattoriin yön yli (kuva 17F) ja näytteiden ATP-konsentraatiot mitattiin. Seuraavana päivänä (2. osa) kaivoista kerättiin basaalinäytteet (kuva 17G), minkä jälkeen soluja indusoiitiin jälleen indusointimeduumeilla (kuva 17H) ja solujen annettiin levätä inkubaattorissa indusointimeduumeissaan 30–60 minuutin ajan (kuva 17I). Lepäämisinkubaation jälkeen kasvatuksista kerättiin näytteitä eri aikapisteissä (kuva 17J) ja jatkettiin ATP-tasojen mittaamiseen, jonka jälkeen koe lopetettiin.



**Kuva 17. ATP-mittausten perusprotokolla.** (A) Solut lajiteltiin solulajittelijalla, minkä jälkeen solut jaettiin kuoppalevyn kaivoihin (B) ja levyt laitettiin inkuboitumaan joko yhdeksi tunniksi tai yön yli seuraavaa päivää odottamaan (C). Inkubaation jälkeen kuoppiin lisättiin erilaisia ATP:tä, GnRH:ta ja POM1:tä sisältäviä indusointimeduumeja (D) ja kuopista kerättiin näytteitä esitetyissä aikapisteissä (E). Ensimmäisen päivän päätteeksi levyt laitettiin inkubaattoriin yön yli seuraavaa päivää odottamaan (F). Seuraavana päivänä kuopista kerättiin basaalinäytteet (G), minkä jälkeen kuoppiin lisättiin indusointimeduumeja (H) ja levyjä inkuboitiin 30–60 minuutin ajan (I). Kuopista kerättiin näytteitä esitetyissä aikapisteissä (J). Kuva on tehty BioRender-ohjelmalla.

### 3.4.2. Yhteiskasvatuksissa pitMØ-solut reagoivat GnRH-stimulaatioon

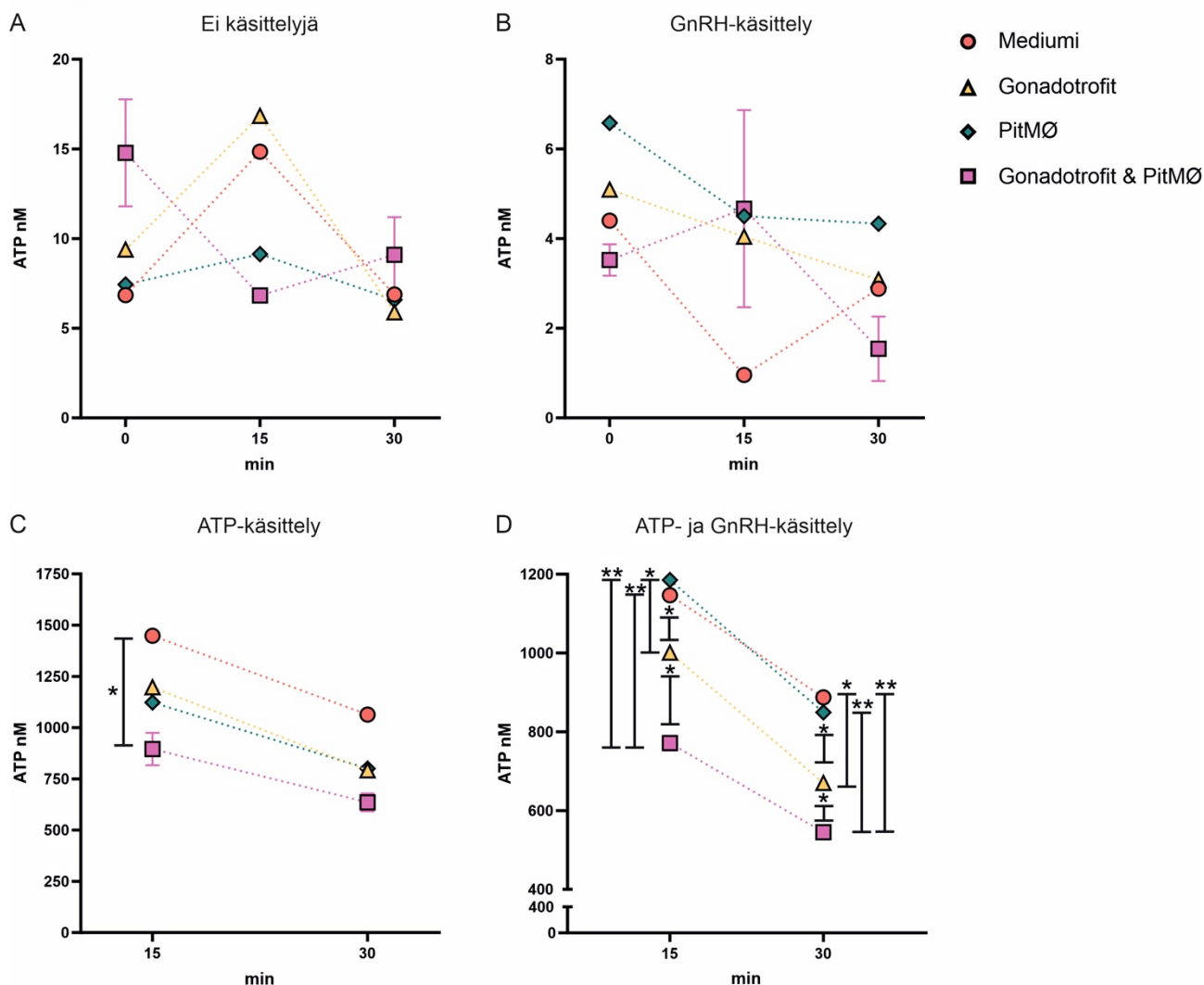
PitMØ-solujen ja gonadotrofin ATP- ja GnRH-käsitelty yhteiskasvatus oli kaikissa ATP-konsentraatioita mittaavissa kokeissa tärkein tarkkailun kohde. Kontrolleja olikin tästä syystä

paljon: (1.) pelkkää mediumia sisältänyt näyte, (2.) pitMØ-solujen yksittäiskasvatus, (3.) gonadotrofien yksittäiskasvatus, (4.) pitMØ-solujen ja gonadotrofien yhteiskasvatukset, (5.) POM1:tä sisältänyt pitMØ-solujen yksittäiskasvatus sekä (6.) POM1:tä sisältänyt gonadotrofien yksittäiskasvatus.

Ensimmäisessä ATP-konsentraatiota mittaavassa kokeessa koejärjestelyä testattiin lisäämällä ATP- ja GnRH-käsittelyt eri aikaan ja sitten keräämällä näytteet 2–3 aikapisteestä. Solut lajiteltiin BD S8 Discover -lajittelijalla, jolta saatiin soluja siten, että kuhunkin kaivon saatiin noin 6000 pitMØ-solua ja noin 6400 gonadotrofia. Ennen ATP:n lisäämistä, kaikkien näytteiden (kuva 18A ja B) ATP-konsentraatiot ovat alle 20:n nM:n. Lisäksi kontrollina toimineen mediumnäytteen ATP-konsentraatio heittelee (kuva 18A ja B) ja laskee (kuva 18C ja D). ATP:tä sisältämättömissä näytteissä mediumnäytteen ATP-konsentraatioiden tulisi olla nollassa ja ATP:tä sisältävissä näytteissä niiden tulisi pysyä tasaisena aikapisteestä toiseen. Nämä muutokset ATP-konsentraatioissa aikapisteiden välillä voivat johtua esimerkiksi mediumin sisältäneestä FCS-seerumista, joka sisältää ATP:tä hajottavia tekijöitä, kontaminaatiosta tai vain mediumista lähtevästä taustasignaalista.

Käsittämättömissä ja GnRH-käsitellyissä näytteissä ATP-konsentraatioiden välillä ei ole merkittäviä eroja lainkaan (kuva 18A ja B). ATP-käsitellyissä näytteissä ATP-konsentraatioiden välillä ei ole merkittäviä eroja, paitsi mediumnäytteen ja yhteiskasvatuksen välillä 15:n minuutin kohdalla (kuva 18C). Sen sijaan ATP- ja GnRH-käsitellyissä näytteissä kaikkien, paitsi mediumnäytteen ja pitMØ-solujen yksittäiskasvatuksen, näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä on merkittäviä eroja molemmissa aikapisteissä (kuva 18D).

## Koe I Päivä 1



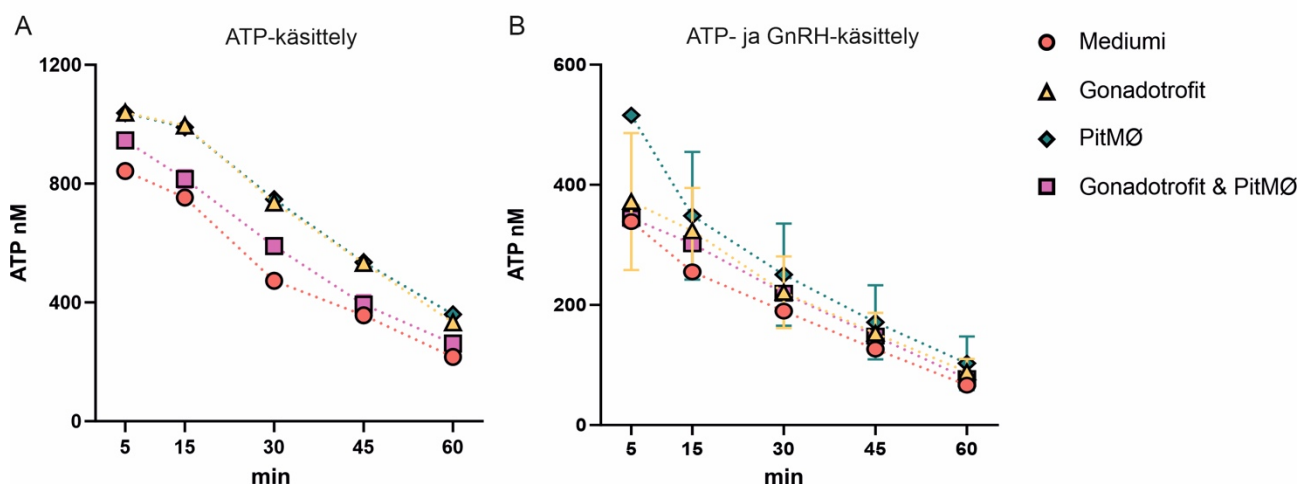
**Kuva 18. Ensimmäisen kokeen ensimmäinen päivä, jossa lajitelluista pitMØ-solujen ja gonadotrofiien yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP- ja GnRH-käsittelyiden jälkeen.** (A) ATP-konsentraatiot 0:n, 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, käsittelemättömistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. (B) ATP-konsentraatiot 0:n, 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, GnRH-käsittelyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. (C) ATP-konsentraatiot 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsittelyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. (D) ATP-konsentraatiot 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP- ja GnRH-käsittelyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  Tilastollista merkittävyyttä on testattu kaksisuuntaisella ANOVA-testillä.

Kokeen seuraavalle päivälle koejärjestelyjä muutettiin ensimmäisen päivän tulosten perusteella.

Aikapisteitä lisättiin, sillä haluttiin selvittää, aktivoituvatko solut käyttämään ATP:tä enemmän 30 minuutin jälkeen, jolloin konsentraatio laskisi enemmän ja nopeammin, vai jatkuuko konsentraation laskeminen samalla tavalla kuin 30:een minuuttiin saakka. ATP- ja GnRH-käsittelyt lisättiin samaan aikaan, jotta voitiin nähdä niiden todellinen yhteisvaikutus (kuva 19). Tehtiin kaksi erilaista ATP-käsittelyä, sillä edellisenä päivänä kasvatuksiin oltiin jo lisätty ATP:tä, joka olisi vääristänyt perus-ATP-konsentraatioiden mittaamista eikä siten antanut todenmukaista tulosta.

Useamman aikapisteen kohdalla huomataan kaikkien näytteiden, mediumnäytteen mukaan lukien, ATP-konsentraatioiden laskevan tasaisesti (kuva 19A ja B). Erot kaikkien näytteiden ATP-konsentraatioissa ovat pienempiä kuin kokeen ensimmäisenä päivänä, eikä tilastollisesti merkittäviä eroja toisen päivän näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä olekaan. PitMØ-solujen ja gonadotrofien yksittäiskasvatusten ATP-konsentraatiot ovat yhteiskasvatusta korkeampia (kuva 19A ja B).

## Koe I Päivä 2



**Kuva 19. Ensimmäinen koe, jossa lajitelluista pitMØ-solujen ja gonadotrofien yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP- ja GnRH-käsittelyiden jälkeen. (A) ATP-konsentraatiot 5:n, 15:n, 30:n, 45:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsitellyistä näytteistä kokeen toisena päivänä. (B) ATP-konsentraatiot 5:n, 15:n, 30:n, 45:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP- ja GnRH-käsitellyistä näytteistä kokeen toisena päivänä.**

Koska mediumnäytteen ATP-konsentraatio laski samalla tavalla, kuin solukasvatustenkin, päätettiin seuraavassa kokeessa tehdä kasvatusmediumin sisältämälle FCS-seerumille lämpökäsittely, joka inaktivoi sen sisältämiä ATP:tä hajottavia tekijöitä. Lämpökäsittely tehtiin inkuboimalla FCS-seerumia 55 °C:ssa viiden minuutin ajan ennen DMEM-mediumiin lisäämistä.

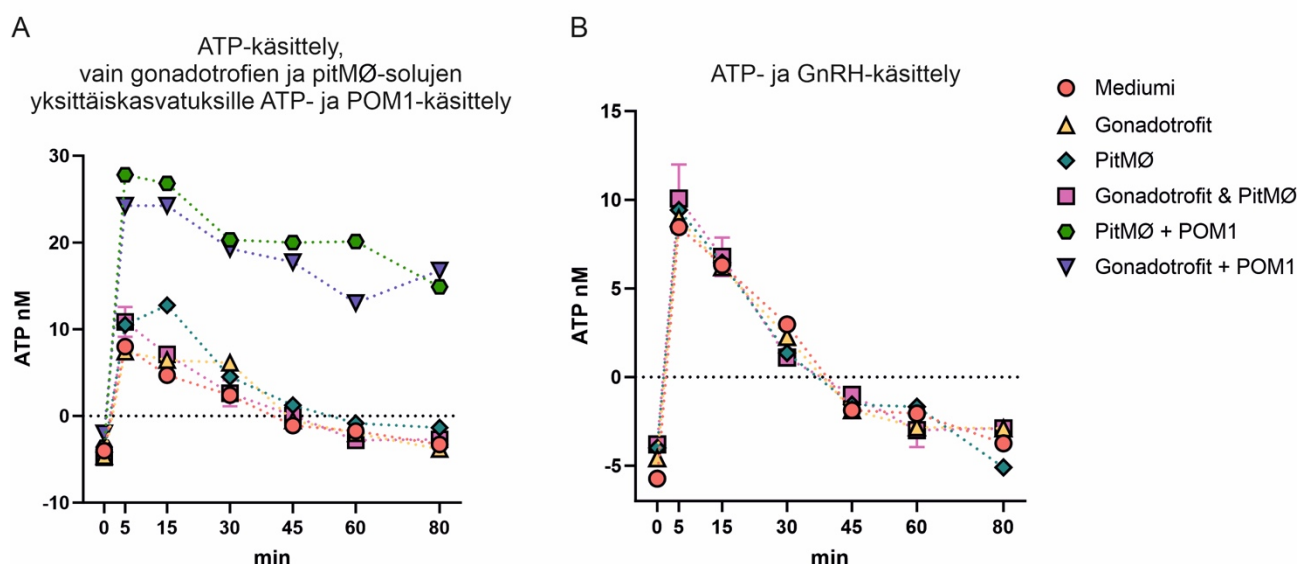
Toisessa kokeessa solujen lajittelu tehtiin SONY SH8-lajittelijalla Discover-lajittelijan toimimattomuudesta takia. Tästä johtuen solujen saanto lajittelusta oli alhaisempaa, kuhunkin kaivon saatiin noin 3200 kappaletta kutakin solutyyppejä. Solujen käsittelyt tehtiin vasta lajittelua seuraavana päivänä.

PitMØ-solujen ja gonadotrofien yksittäiskasvatuksia tehtiin myös POM1:llä käsiteltyinä tavallisten yksittäiskasvatusten lisäksi, jolloin saatiin kaksi kontrollinäytettä lisää (kuva 20A). Näin tehtiin, jotta voitiin nähdä, pysyykö ATP:n konsentraatio tasaisena vai esimerkiksi nouseeko se. ATP-konsentraation pysyessä tasaisena, solut eivät joko käytä sitä tai käyttävät ja tuottavat sitä samanaikaisesti. ATP-konsentraation noustessa solut tuottavat sitä enemmän kuin käyttävät, kun

taas ATP-konsentraation laskiessa solut käyttävät sitä enemmän kuin tuottavat. Esimerkiksi, mitä enemmän gonadotrofit käyttävät ATP:tä, sitä enemmän ne tuottavat ja erittävät hormonejaan.

Molemmassa käsittelyssä (kuva 20A ja B) kaikkien näytteiden ATP-konsentraatiot ovat alle 30:n nM:n, osan konsentraatioista ollessa jopa negatiivisia, ja mediumnäytteiden konsentraatioiden laskien muiden näytteiden kanssa samalla tavalla. Nämä seikat osoittavat, että mediumin sisältämän FCS-seerumin lämpöinaktivaatio ei ollut toiminut halutulla tavalla ja seerumi on aiheuttanut ATP:n hajoamisen tai, että käytetty ATP-liuos ei toiminut tarkoitetulla tavalla. Joka tapauksessa, konsentraatioiden ollessa näin matalia, tulokset eivät ole luotettavia eikä näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä ole tilastollisesti merkittäviä eroja.

## Koe II

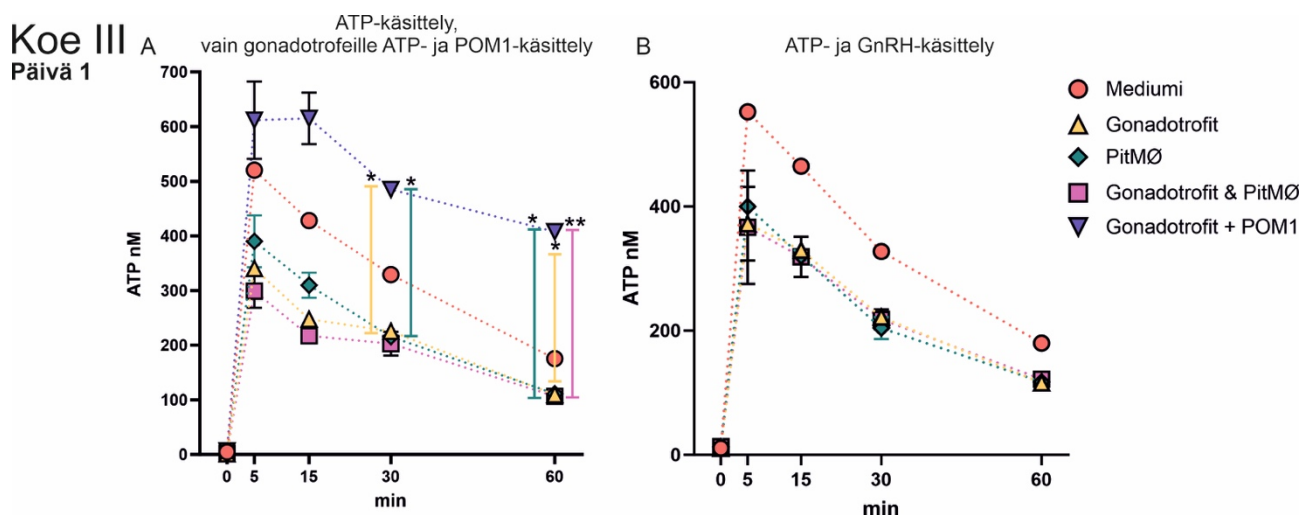


**Kuva 20. Toinen koe, jossa lajitelluista pitMØ-solujen ja gonadotrofiin yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyiden jälkeen.** (A) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n, 45:n, 60:n ja 80:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsittelyistä näytteistä. Gonadotrofiin ja pitMØ-solujen yksittäis- ja yhteiskasvatuksille tehtiin lisäksi POM1-käsittely. (B) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n, 45:n, 60:n ja 80:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP- ja GnRH-käsittelyistä näytteistä. Kaikki näytteet kerättiin kokeen toisena päivänä.

Kolmannelta koetta varten solut lajiteltiin BD S8 Discover -lajittelijalla, jolta saatiin enemmän soluja kuin toisessa kokeessa: kuhunkin kaivoon saatiin noin 5000 pitMØ-solua ja noin 6600 gonadotrofia. Aikapisteitä vähennettiin edellisestä kokeesta yhdellä, ja vain gonadotrofiin yksittäiskasvatukseen lisättiin POM1:tä, sillä pitMØ-soluja ei riittänyt ylimääräiseen POM1-kontrollinäytteeseen.

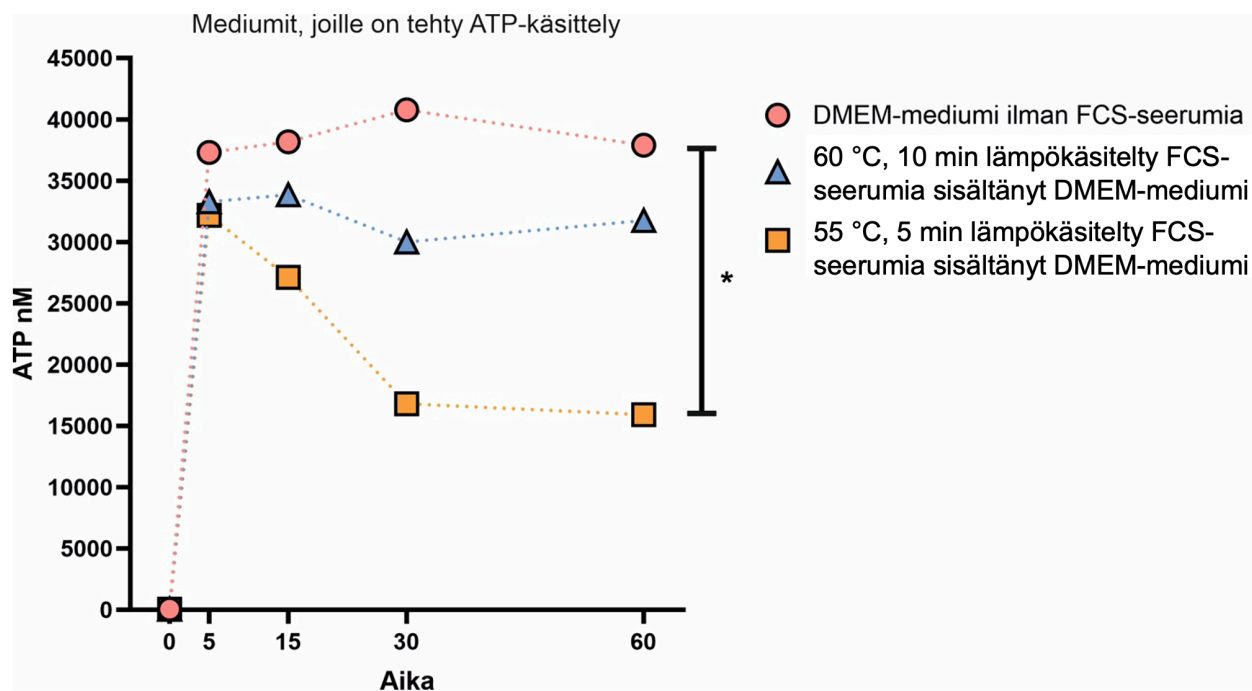
Mediumissa käytettiin kokeen ensimmäisenä päivänä 55 °C:ssa viiden minuutin ajan lämpöinaktivoitua FCS-seerumia (kuva 21A ja B). Siitä huolimatta mediumnäytteiden ATP-

konsentraatiot ovat korkeampia kuin muiden ensimmäisen päivän näytteiden, mutta ne laskevat siitä huolimatta samalla tavalla kuin kaikkien muidenkin näytteiden ATP-konsentraatiot (kuva 21A ja B). ATP- ja POM1-käsiteltyjen gonadotrofin ATP-tasot eroavat tilastollisesti merkittävästi 30:n minuutin kohdalla pitMØ-solujen ja gonadotrofin yksittäiskasvatusten ATP-konsentraatioista ja 60:n minuutin kohdalla lisäksi myös yhteiskasvatuksen ATP-konsentraatiosta (Kuva 21A). Muutoin kokeen ensimmäisenä päivänä tilastollisesti merkittäviä eroja näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä ei ole.



**Kuva 21. Kolmas koe, jossa lajitelluista pitMØ-solujen ja gonadotrofin yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyiden jälkeen.** (A) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsitellyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. Gonadotrofin yksittäiskasvatukselle tehtiin lisäksi POM1-käsittely. (B) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP- ja GnRH-käsitellyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Tilastollista merkittävyyttä on testattu kaksisuuntaisella ANOVA-testillä.

Mediumnäytteiden ATP-konsentraation laskemisen vuoksi kokeiltiin seurata eri tavoin käsiteltyjen mediumien ATP-konsentraatioita (kuva 22). Pelkkää DMEM-mediumia sisältäneen näytteen ATP-konsentraatiot pysyivät kaikissa aikapisteissä varsin tasaisesti yli 35 000:n nM:n (kuva 22). Sen sijaan FCS-seerumia sisältäneiden näytteiden ATP-konsentraatiot laskivat, eritoten 55 °C:ssa viiden minuutin ajan lämpökäsitellyn FCS-seerumia sisältäneen mediumnäytteen, jonka ATP-konsentraatioissa tapahtui tilastollisesti merkittävä lasku seerumittomaan mediumiin verrattuna (kuva 22). Verrattuna 60 °C:ssa kymmenen minuutin ajan lämpökäsitellyyn FCS-seerumia sisältäneeseen mediumnäytteeseen, jonka ATP-konsentraatiot eivät laskeneet seerumittomaan mediumiin verrattuna tilastollisesti merkittävällä tavalla.

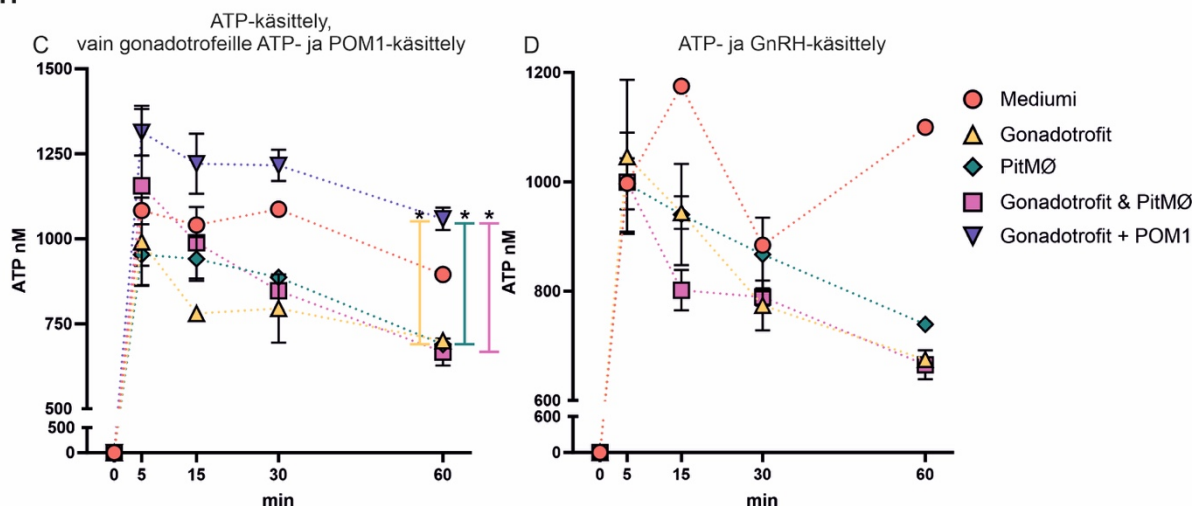


**Kuva 22. Mediumien sisältämien ATP-konsentraatioiden vertaileminen.** ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä ATP-käsitellyistä mediumnäytteistä. Tilastollista merkitystä on mitattu kaksisuuntaisella ANOVA-testillä. \* $p < 0.05$ .

Kolmannen kokeen toisena päivänä käytettiinkin siis mediumia, joka sisälsi 60 °C:ssa kymmenen minuutin ajan lämpökäsiteltyä FCS-seerumia (kuva 23). Tämän seurauksena kuvassa 23A mediumnäytteen ATP-konsentraatio laskee yhä lämpökäsittelystä huolimatta, mutta hieman tasaisemmin kuin kahdessa aikaisemmassa kokeessa. Kun taas kuvassa 23B mediumnäytteen ATP:n konsentraatio nousee ja laskee huomattavasti noin 900:n ja 1200:n nM:n välillä. Kuten kokeen ensimmäisenäkin päivänä, ATP- ja POM1-käsiteltyjen gonadotrofiin ATP-konsentraatio eroaa 60:n minuutin kohdalla tilastollisesti merkittävästi pitMØ-solujen ja gonadotrofiin yksittäiskasvatusten sekä yhteiskasvatusten ATP-konsentraatioista, eikä muita tilastollisesti merkittäviä eroavaisuuksia ole huomattavissa näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä (kuva 23A ja B).

## Koe III

Päivä 2



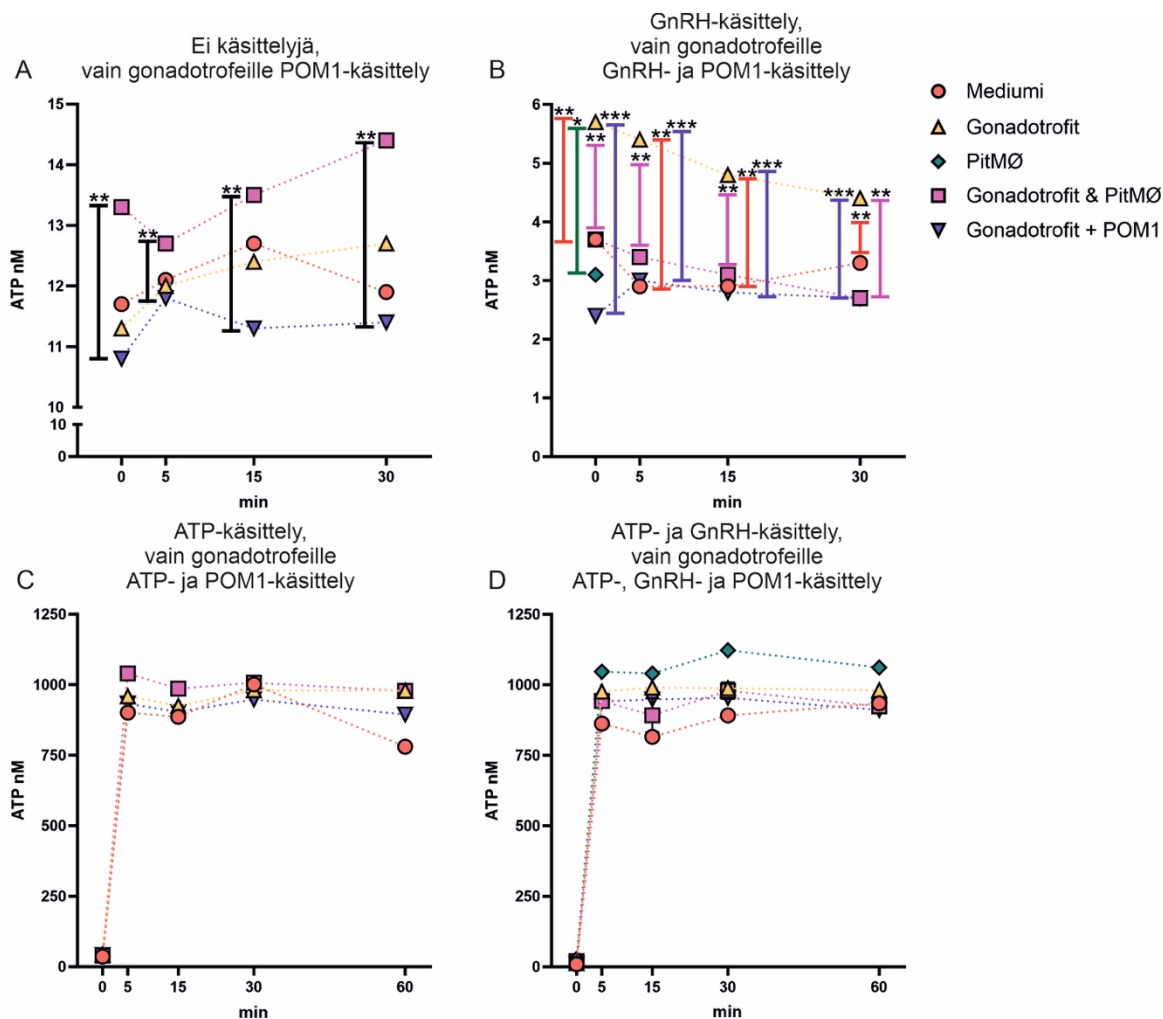
**Kuva 23. Kolmas koe, jossa lajitteluista pitMØ-solujen ja gonadotrofien yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyiden jälkeen.** (A) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsittelyistä näytteistä kokeen toisena päivänä. Gonadotrofien yksittäiskasvatukselle tehtiin lisäksi POM1-käsittely. (B) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n, 30:n ja 60:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP- ja GnRH-käsittelyistä näytteistä kokeen toisena päivänä. \* $p < 0.05$ . Tilastollista merkittävyyttä on testattu kaksisuuntaisella ANOVA-testillä.

Kolmannen kokeen ATP-konsentraatiot ovat toiseen kokeeseen verrattuna korkeampia, mikä indikoi korkeamman solumäärän ja korkeammassa lämpötilassa sekä pidempään lämpöinaktivoidun FCS-seerumin toimivan koejärjestelyssä paremmin kuin alhaisempi solumäärä ja alhaisemmassa lämpötilassa sekä lyhyempään lämpöinaktivoidun FCS-seerumin.

Neljännessä kokeessa solujen lajittelu tehtiin BD S8 Discover -lajittelijalla. Kaivoihin saatiin noin 5000 kappaletta kutakin solutyyppeä, pitMØ-soluja ja gonadotrofeja. Käsittelyt aloitettiin lajittelusta seuraavana päivänä. Tässä kokeessa kerättiin ensimmäisen kokeen lailla kaivoista näytteitä ilman ATP-käsittelyä, jotta voitiin nähdä, vaikuttiko FCS-seerumin lämpöinaktivaatio 60 °C:ssa ATP-konsentraatioihin ennen ATP:n lisäämistä (kuva 24A ja B). Kaikkien ATP-käsittelymättömien näytteiden ATP-konsentraatiot ovat alle 15:n nM:n, eli virheellistä taustasignaalia on edelleen. Käsittelymättömien yhteiskasvatuksen ja POM1-käsittelyjen gonadotrofien yksittäiskasvatuksen ATP-konsentraatioissa on tilastollisesti merkittävä ero kaikissa aikapisteissä (kuva 24A). Poiketen kaikista muista kokeista yhteiskasvatuksen ATP-konsentraatiot ovat odottamattomasti kaikista näytteistä korkeimmat ja POM1-käsittelyjen gonadotrofien kaikista matalimmat (kuva 24A). GnRH-käsittelyjen näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä on tilastollisesti merkittäviä eroavaisuuksia kaikissa aikapisteissä, eritoten gonadotrofien yksittäiskasvatuksen, POM1-käsittelyjen gonadotrofien yksittäiskasvatuksen, yhteiskasvatuksen ja mediumnäytteen välillä (kuva 24B). ATP- sekä ATP- ja GnRH-käsittelyjen näytteiden ATP-konsentraatiot taas ovat tasaisia, mutta laskevat hieman, mukaan lukien mediumnäytteen ATP-konsentraatio (kuva 24C ja D). Tämä

kertoo, että lämpöinaktivoitu FCS-seerumi aiheuttaa yhä ATP:n hajoamista. Kuvien 24C ja D näytteiden ATP-konsentraatioiden välillä ei myöskään ole tilastollisesti merkittäviä eroavaisuuksia.

## Koe IV Päivä 1



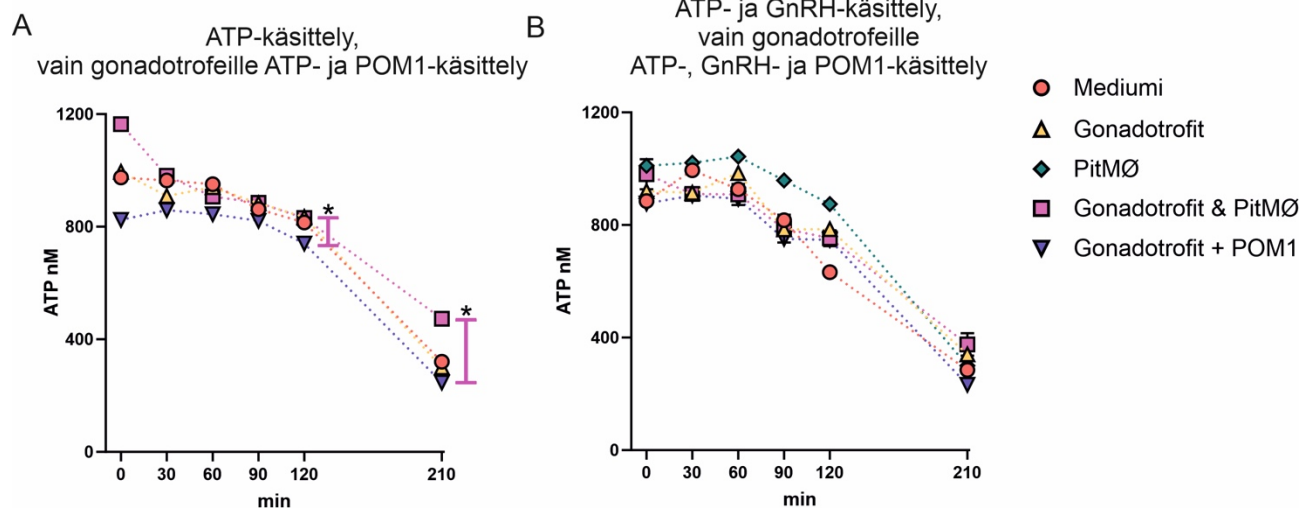
**Kuva 24. Neljäs koe, jossa lajitelluista pitMØ-solujen ja gonadotrofin yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyiden jälkeen.** (A) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, käsittelemättömistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. Gonadotrofin yksittäiskasvatukselle tehtiin POM1-käsittely. (B) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, GnRH-käsitellyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. Gonadotrofin yksittäiskasvatukselle tehtiin POM1-käsittely. (C) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsitellyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. Gonadotrofin yksittäiskasvatukselle tehtiin POM1-käsittely. (D) ATP-konsentraatiot 0:n, 5:n, 15:n ja 30:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP- ja GnRH-käsitellyistä näytteistä kokeen ensimmäisenä päivänä. Gonadotrofin yksittäiskasvatukselle tehtiin POM1-käsittely. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Tilastollista merkittävyyttä on testattu kaksisuuntaisella ANOVA-testillä.

Neljännän kokeen seuraavana päivänä näytteitä kerättiin lisäksi kolmessa uudessa aikapisteessä, jotta voitiin tarkastella, laskevatko vai tasaantuvatko ATP-konsentraatiot yhä 60:n minuutin aikapisteen jälkeen käsittelyistä (kuva 25A ja B). Jos ATP-konsentraatiot tasaantuisivat, voisi se merkitä esimerkiksi ATP:n erittymisen lisääntymistä tai sen käytön vähenemistä. Konsentraatiot kuitenkin jatkavat laskemistaan, eli siihen vaikuttavia muutoksia solujen toiminnassa ei tapahtunut. ATP-konsentraatiot laskevat mediumnäytteissä vielä toisenakin päivänä, eli FCS-seerumin

lämpöinaktivaatio ei vielääkään toiminut halutulla tavalla. ATP-konsentraatioiden välillä ei myöskään ole tilastollisesti merkittäviä eroja, paitsi ATP-käsiteltyjen yhteiskasvatuksen ja POM1-käsiteltyjen gonadotrofiin välillä 120:n ja 210:n minuutin kohdilla (kuva 25A ja B).

## Koe IV

### Päivä 2



**Kuva 25. Neljäs koe, jossa lajitelluista pitMØ-solujen ja gonadotrofiin yksittäis- ja yhteiskasvatuksista mitattiin ATP-konsentraatioita erilaisten ATP-, GnRH- ja POM1-käsittelyiden jälkeen.** (A) ATP-konsentraatiot 0:n, 30:n, 60:n, 90:n, 120:n ja 210:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsitellyistä näytteistä kokeen toisena päivänä. Gonadotrofiin yksittäiskasvatukselle tehtiin lisäksi POM1-käsittely. (B) ATP-konsentraatiot 0:n, 30:n, 60:n, 90:n, 120:n ja 210:n minuutin kohdalla kerätyistä, ATP-käsitellyistä näytteistä kokeen toisena päivänä. Gonadotrofiin yksittäiskasvatukselle tehtiin lisäksi POM1-käsittely. \* $p < 0.05$ . Tilastollista merkittävyyttä on testattu kaksisuuntaisella ANOVA-testillä.

## 4. Tulosten tarkastelu

Makrofagit ovat synnynnäisen immunitetin soluja, jotka elävät kaikissa kehon kudoksissa ylläpitäen ja tukien kudosten toimintaa. Makrofageja on kolmea eri alkuperää: ruskuaispussista, alkion maksasta ja luuytimeistä. Aivolisäke on pieni kallonpohjassa sijaitseva hormonikudos, joka säätelee tuottamallaan hormoneilla elimistön toimintaa ja hormonitasapainoa hypotalamuksen avustamana. Aivolisäkkeen tiedetään sisältävän kuusi alkioperäistä makrofagipopulaatiota, joita kutsutaan kollektiivisesti pitMØ-soluiksi (Lehtonen ja muut 2025). Kun näiden pitMØ-solujen pääsy aivolisäkkeeseen alkion varhaisessa kehitysvaiheessa (E6.5) estetään, eli makrofagit depletoidaan kudoksista, aivolisäkkeen etulohkon gonadotrofien luteinisoivan hormonin erityys laskee (Lehtonen ja muut 2025). Tässä pro gradu -tutkielmassa haluttiin selvittää, vaikuttavatko pitMØ-solut gonadotrofien toimintaan myös in vitro -primäärikasvatuksissa.

### 4.1. GnRHR-primäärivasta-aine toimii hiiren aivolisäkkeessä AF488- ja AF546-sekundäärivasta-aineiden kanssa

GnRHR-primäärivasta-aineen tiedetään toimivan hiiren aivolisäkkeessä, mutta koska se on primäärivasta-aine eikä siten sisällä fluorokromia, jonka avulla GnRHR-primäärivasta-aineen lokalisaatiota voisi seurata, tuli sen toimivuutta eri fluorokromikonjugoitujen sekundäärivasta-aineiden kanssa testata ja optimoida tämän tutkielman immunohistokemiallisia ja virtaussytometriakokeita varten. Tässä tutkielmassa päädyttiin AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen käyttämiseen GnRHR-primäärivasta-aineen kanssa immunohistokemiallisissa jääleikevärjäyksissä ja virtaussytometriakokeissa. Tähän tulokseen päädyttiin, sillä vertailtaessa saatua signaalia AF488- ja AF647-fluorokromikonjugoiduista sekundäärivasta-aineista saatujen signaalien kanssa, oli AF546-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen signaali spesifisempi kuin AF647-fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen. AF488-fluorokromikonjugoitua sekundäärivasta-ainetta ei päädytty käyttämään, vaikka se olikin signaaliltaan lähes yhtä vahva kuin AF546-fluorokromikonjugoitu sekundäärivasta-aine, sillä AF488-fluorokromikonjugoitua F4/80-vasta-ainetta käytettiin virtaussytometriapaneelissa, joka oli ryhmässä jo valmiiksi suunniteltu ja optimoitu (Lehtonen ja muut 2025).

### 4.2. Hiiren aivolisäkkeessä on GnRHR-positiivinen makrofagien alapopulaatio

Vatsakalvon makrofagien on osoitettu ilmentävän GnRH-reseptoria pinnallaan ja GnRH-stimulaatio saa aikaan solunsisäisen kalsiumpitoisuuden nousemisen (Min ja muut 2009). Makrofagien tiedetään ilmentävän pinnallaan myös muiden hormonien ja hermovälittäjäaineiden reseptoreja (Jurberg ja muut 2018). Nämä seikat ja pitMØ-solujen roolin gonadotrofien hormonituotannossa

huomioon ottaen, hypoteesina oli, että myös pitMØ-solut ilmentävät GnRH-reseptoria pinnallaan. Hiiren aivolisäkkeen etulohkosta löydettiin pieni GnRHR-positiivinen pitMØ-populaatio virtausytometrisellä analyysillä.

Tämä löydetty GnRHR-positiivinen pitMØ-alapopulaatio on kuitenkin kooltaan pieni verrattuna kaikkiin aivolisäkkeen makrofageihin. Tämä voisi viitata siihen, että näitä kyseisiä makrofageja sijaitsisi mahdollisesti vain lähellä gonadotrofeja, jotka ovat aivolisäkkeen endokriinisolupopulaatioista toiseksi pienin (Ooi ja muut 2004; Stojilkovic ja muut 2010), mikä voisi selittää myös GnRHR-positiivisten makrofagien vähäistä määrää.

Näitä virtausytometrisia kokeita varten hyödynnettiin jo ryhmässä käytettyä pitMØ-virtausytometripaneelia (Lehtonen ja muut 2025). Paneelia muokattiin korvaamalla GnRHR-AF546-primääri-sekundäärivasta-aineparilla eräs paneelin sisältämä, tälle tutkielmalle tarpeeton vasta-aine. Näin ollen kokeissa ei käytetty aivolisäkkeen takalohkoa lainkaan. Koska uutta virtausytometripaneelia ei tehty, on olemassa mahdollisuus, että tämä GnRHR-positiivisten pitMØ-solujen populaatio on joko osittain tai täysin virheellistä signaalia. Sen vuoksi tätä koetta voisi tulevaisuudessa jatkaa tekemällä uuden vasta-ainepaneelin, jossa käyttäisi GnRHR-primäärivasta-aineen kanssa mahdollisimman kirkasta fluorokromikonjugoitua sekundäärivasta-ainetta. Kokeen voisi tehdä mahdollisesti myös spektraalivirtausytometrillä perinteisen virtausytometrin sijaan, jolloin heikkoakin signaalia voitaisiin paremmin erottaa muista signaaleista.

On mahdollista, että pitMØ-solut ilmentävät myös muita aivolisäkkeen hormonisolujen ilmentämiä reseptoreja hypotalamuksen aivolisäkkeeseen erittämille hormoneille, kuten kasvuhormonia vapauttava hormoni, GHRH, tai prolaktiinia vapauttava hormoni, PRH. PitMØ-solu voisi ilmentää pinnallaan useita eri hormonireseptoreja, niin hypotalamuksen erittämille hormoneille kuin itse aivolisäkkeenkin hormoneille. Jatkotutkimuksissa samanlaisten analyysien toisto eri aivolisäkkeen hormonireseptorien kanssa toisi tarvittavaa tietoa makrofagien ja hormoneja tuottavien solujen yhteistyöstä.

#### **4.3. PitMØ-soluja ja gonadotrofeja voidaan lajitella fluorokromiavusteisesti solulajittelijoilla**

Gonadotrofien ja pitMØ-solujen lajitteluprotokolla solulajittelijoille saatiin optimoitua. Näitä kahta solupopulaatiota lajiteltiin fluorokromiavusteisesti kahdella solulajittelijalla, SONY SH800:lla ja BD S8 Discover -lajittelijalla. BD S8 Discover -solulajittelija on spektraalinen, mikä mahdollistaa laajemman vasta-ainepaneelin käytön. Tätä tutkielmaa varten lajittelupaneeli pidettiin tästä

huolimatta samana, kuin SONY SH800:lla, jolla lajittelupaneeli ja ensimmäiset lajittelut tehtiin ennen BD S8 Discover -lajittelijaa. Uutta paneelia ei lähdetty optimoimaan, jotta tulokset kahden solulajittelijan välillä olisivat vertailukelpoisia. SONY SH800:lla saanto oli alhaisempaa ja mahdollisuus paneelin laajentamiseen on huonompi kuin BD S8 Discover -lajittelijalla. Tämän vuoksi, jos solujen lajittelemista joko ATP- tai muita kokeita varten halutaan jatkaa, on kannattavampaa jatkaa niitä BD S8 Discover -lajittelijalla.

Virtaussytometrisista kokeista poiketen, solujen lajittelemisessa käytettiin koko aivolisäkettä, sillä lajittelusta haluttiin saada mahdollisimman paljon gonadotrofeja ja pitMØ-soluja talteen, mitä takalohkon poisjättäminen olisi saattanut vähentää.

Kudosspesifisten makrofagien tutkiminen in vitro -ympäristöissä on haastavaa, sillä ne ovat, kuten kaikki muutkin solutyypit, hyvin sidonnaisia kudoksiensa viitekehukseen. Näin ollen solujen fenotyyppi ja siten myös toiminta voi muuttua, kun ne poistetaan kudoksestaan, mikä voi vääristää tuloksia niiden toimintaa tutkittaessa. Pitkän lajitteluprotokollan vuoksi on myös epävarmaa, kuinka paljon soluja pysyy alkuperäisessä fenotyyppissään ja elävänä kokeen loppuun saakka. Tämä näkyi esimerkiksi, kun osassa kokeissa valmiin värjätyn näytteen suodattaminen putkiin lajittelua varten oli miltei mahdotonta, sillä suspensio ei mennyt suodattimista juurikaan läpi. Tulevaisuudessa tulisikin työskennellä värjäysprotokollan lyhentämiseksi, joka onnistuisi, jos GnRHR-primäärivasta-aineesta saataisiin fluorokromikonjugoitu vasta-aine, joko kaupallinen tai itse konjugoitu.

#### **4.4. PitMØ-solut reagoivat GnRH-stimulaatioon primäärikasvatuksissa**

ATP-konsentraatioita mittaavien kokeiden perusprotokolla saatiin optimoitua, mutta koejärjestelyn kaikkia yksityiskohtia ei saatu optimoitua. Kokeiden protokollat muuttuivat jokaisen kokeen kohdalla, johtuen siitä, että protokolla oli täysin uusi. Lisäksi jokaisessa kokeessa muutettiin protokollan yksityiskohtia saatujen tulosten perusteella. Luonnollisesti tämä yksityiskohtien muuttaminen kokeiden välillä kuuluu optimointiprosessiin.

Mahdollisia virhetekijöitä kokeessa ovat ATP-kokeiden välinen vaihtelevuus niin kerättyjen näytteiden aikapisteissä, indusointimediumeissa kuin solutyypikasvatusten määrissäkin. Kerätyt aikapisteet voivat olla liian lähellä toisiaan antaakseen totuudenmukaisen kuvan ATP:n hajoamisesta. Myös käytetty mediumi muuttui, kun sitä optimoitiin kokeiden lomassa. Kolmessa viimeisessä kokeessa päädyttiin käyttämään mediumeja, joiden sisältämä FCS-seerumi oli lämpökäsitelty, sillä FCS sisältää ATP:tä hajottavia tekijöitä.

Yhtenä kokeiden pääongelmista on mediumnäytteistä saatu taustasignaali ja ATP:n hajoaminen mediumnäytteissä. Mediumista saatua taustasignaalia oli itse mediumnäytteiden lisäksi kaikissa muissakin näytteissä, jotka luonnollisesti sisälsivät mediumia. ATP:n hajoamista koetettiin vähentää inaktivoimalla mediumin sisältämä FCS-seerumi, mikä auttoi hieman, muttei täysin korjannut ongelmaa. Tämän vuoksi olisikin tärkeää optimoida koejärjestelyä ilman FCS-seerumia. FCS-seerumin poisjättämisessä ongelmana on, että se parantaa solujen viabiliteettia kasvatuksissa.

PitMØ-näytteiden sisältämät ATP-konsentraatiot ovat ATP- sekä ATP- ja GnRH-käsitellyistä näytteistä usein korkeimpia. Tämä kertoo siitä, että ne todennäköisesti tuottavat hieman ATP:tä normaalitilassa, mutta reagoivat GnRH-stimulaatioon tuottamalla ATP:tä vielä enemmän. Tätä tulkintaa tuloksista vahvistaa se, että kontrolleina toimineiden mediumnäytteiden ATP-konsentraatiot ovat useimmissa kokeissa matalampia kuin pitMØ-solujen ATP- sekä ATP- ja GnRH-käsitellyissä näytteissä. Huomioitavaa on myös, että ATP-käsitelyjen pitMØ-solujen ATP-konsentraatiot eivät jokaisessa kokeessa ole matalampia kuin ATP- ja GnRH-käsitelyjen näytteiden, vaan ne ovat lähempänä kaikkien muiden näytteiden ATP-konsentraatioita. ATP- ja GnRH-käsitellyillä pitMØ-soluilla ATP-konsentraatiot olivat useassa kokeessa jopa hieman matalammat kuin vain ATP-käsitellyillä pitMØ-soluilla, mikä kertoisi GnRH-stimulaation aiheuttavan ATP:n kulutusta pitMØ-soluissa.

Makrofagien tiedetään ilmentävän pinnallaan purinergistä ionikanavareseptoria P2X7R:ää, joka päästää lävitseen niin kaliumia, kalsiumia kuin natriumiakin (De Torre-Minguela ja muut 2016; Kawamura ja muut 2012; Rotondo ja muut 2022). P2X7R ei ole ainoastaan makrofageissa esiintyvä reseptori, vaan myös monet muut leukosyytit, kuten dendriittisolut, ilmentävät sitä pinnallaan (De Torre-Minguela ja muut 2016; Di Virgilio ja muut 2017). Ei tiedetä, ilmentävätkö pitMØ-solut P2X7-reseptoria pinnallaan, mutta tämä ei vaikuta mahdottomuudelta, sillä pitMØ-solut ilmentävät monia muitakin leukosyyttimarkkereita pinnallaan. Jos oletetaan pitMØ-solujen ilmentävän P2X7-reseptoria, voisi pitMØ-solunäytteiden ATP-konsentraatioiden laskeminen mahdollisesti johtua siitä, että pitMØ-solut itse käyttävät ATP:tä purinergisten P2X7R-ionikanaviensa aktivoimiseen. Tämä P2X7R-välitteinen kalsiuminfluksi voisi olla syynä solunsisäisen kalsiumin konsentraation nousemiseen GnRHR-positiivisissa makrofageissa GnRH-stimulaation seurauksena (Min ja muut 2009). Kalsiumkonsentraation nousemisen on osoitettu saavan aikaan ATP:n vapautumisen makrofageista solun ulkopuoliseen tilaan, mikä voisi vuorostaan aktivoida gonadotrofin purinergisia kalsiumkanavia (Zumerle ja muut 2019). Tämän hypoteesin perusteella olisi mielenkiintoista tehdä esimerkiksi virtaussytometrisia kokeita, joissa tarkasteltaisiin, ilmentävätkö pitMØ-solut pinnallaan P2X7-reseptoria.

Viimeisen koeasetelman toistaminen ja optimointi olisi tarpeellista, jos halutaan tarkempia ja luotettavampia tuloksia. Tähän auttaisi korkeampi solujen saanto solulajittelijoilta, jolloin kuhunkin kasvatukseen saataisiin enemmän soluja, tai solujen inkuboiminen yön yli ennen käsittelyjen aloittamista, jotta solut ehtisivät sopeutua kasvatusolosuhteisiin värjäyksen ja lajittelun aiheuttaman stressin jälkeen. Eräs mahdollisuus solujen alhaisen määrän korjaamiseksi olisi käyttää valmista gonadotrofisolulinjaa ja erilaistaa makrofageja monosyyteistä in vitro. Tämä olisi kuitenkin ongelmallista, sillä in vivo-gonadotrofit eroavat gonadotrofisolulinjoista, kuten myös monosyyteistä erilaistetut makrofagit eroavat ominaisuuksiltaan in vivo-ruskuaispussiperäisistä pitMØ-soluista. Erillisenä kokeena monosyyteistä erilaistettujen makrofagien osallisuus gonadotrofin hormonituotantoon in vitro voisi olla mielenkiintoinen. Kyseinen järjestely saattaisi valaista sitä, onko vain GnRHR-positiivisilla pitMØ-soluilla vaikutusta gonadotrofin hormonituotantoon vai pystyvätkö kaikki muutkin GnRHR-positiiviset makrofagit vaikuttamaan siihen, jos vain solut saataisiin samaan kasvatukseen.

On sekä mahdollista että todennäköistä pitMØ-solujen olevan vain yksi osa gonadotrofin paikallista hormonituotannon säätelemismekanismia. Olisikin siksi tärkeää optimoida koejärjestely, jossa voidaan tarkkailla pitMØ-solujen lisäksi myös esimerkiksi aivolisäkkeen tähtisolujen tai follikulostellaattisolujen mahdollista osallisuutta tähän säätelemekanismiin. Todennäköisesti makrofagien osallisuutta gonadotrofin luteinisoivan hormonin eritykseen olisi parasta mitata in vivo -kokeissa, jolloin solut saisivat olla niille luonnollisessa ympäristössä ja tulokset saattaisivat siten olla myös luotettavampia. Toisaalta in vivo -kokeissa on vaikeampi varmistua, että pitMØ-solut ja gonadotrofit olisivat ainoita tarkkailunalaisia soluja.

Tämä on usein ongelmana myös makrofageja depletoitaessa eli poistettaessa kudoksista, sillä on olemassa vain hyvin harvoja kudosspesifisiä makrofageja, kuten pitMØ-soluja, depletoivia hiirimalleja. Haluttaessa depletoida kudoksista sellaisia makrofageja, joiden depletoimiseen ei ole spesifisiä hiirimalleja, joudutaan turvautumaan systemaattisen makrofagien deplektion aiheuttaviin tekniikoihin. Tämä tarkoittaa, että makrofagien depletoiminen  $\alpha$ CSF1R-vasta-aineella ajankohdassa E6.5 aiheuttaa systemaattisen ruskuaispussiperäisten makrofagien puuttumisen kaikista kudoksista. Systemaattisen deplektion seurauksena monien kudosten, hormonikudosten mukaan lukien, toiminta häiriintyy ja voi olla vaikeaa todistaa, että juuri pitMØ-solujen puute on ainoa syy gonadotrofin hormonitoiminnan häiriintymiselle.

Aivolisäkkeen sukupuolidimorfisuuden huomioon ottaen, olisi mielenkiintoista tutkia, onko GnRHR-positiivisissa pitMØ-soluissa dimorfisuutta, sekä onko naaraiden ja urosten pitMØ-solujen

tuottamien ATP:n määrien välillä eroa. Tässä tutkielmassa käytettiin uroshiiriä kaikissa kokeissa, paitsi virtaussytometriakokeessa, jossa optimoitiin GnRHR-primäärivasta-aineelle fluorokromikonjugoitu sekundäärivasta-ainepari. Tämän vuoksi tätä seikkaa ei voitu tarkastella tässä tutkielmassa.

Nämä ATP-konsentraatioita mittaavat kokeet eivät kykene kertomaan kokonaiskuva pitMØ-solujen ja gonadotrofien välillä tapahtuvasta molekulaarisesta kanssakäymisestä tai gonadotrofien hormonituotannon yksityiskohdista. Ne voivat kuitenkin osoittaa mitä аспектеja tästä kanssakäymisestä olisi kannattavaa tutkia tulevaisuudessakin minkä takia niiden optimointia ja tekemistä tulisi jatkaa.

## Yhteenveto

Tässä tutkielmassa tarkasteltiin aivolisäkkeen makrofagien (pitMØ) osallisuutta gonadotrofiin hormonituotantoon in vitro -primäärikasvatuksissa. Tavoitteina oli optimoida GnRHR-primäärivasta-aineen käyttö fluorokromikonjugoidun sekundäärivasta-aineen kanssa ja selvittää ilmentävätkö pitMØ-solut pinnallaan GnRH-reseptoria (GnRHR). Näiden tavoitteiden lisäksi haluttiin optimoida protokolla solujen lajittelulle, niistä tehtäville primäärikasvatuksille ja ATP-konsentraation mittaauksille. Tutkielmassa hyödynnettiin useita metodeja, virtaussytometrian ja ATP-konsentraatioiden mittausten ollessa niistä tärkeimpiä.

GnRHR-primäärivasta-aineen optimointi fluorokromikonjugoidun vasta-aineen kanssa onnistui, minkä ansiosta pystyttiin osoittamaan pienen populaation pitMØ-soluista ilmentävän GnRH-reseptoria pinnallaan sekä lajittelemaan pitMØ-soluja ja gonadotrofeja primäärikasvatuksia varten. ATP-konsentraatioiden mittaamisen protokolla saatiin optimoitua, vaikkakin sen yksityiskohtien optimointi ei täysin onnistunut. Saatiin selville pitMØ-solujen reagoivan GnRH-stimulaatioon tuottamalla ATP:tä solunulkoiseen tilaan.

PitMØ-solujen osallisuuden gonadotrofiin hormonituotantoon tutkiminen on tärkeää, sillä sen avulla voidaan mahdollisesti kehittää keinoja esimerkiksi hypogonadotrofisen hypogonadismien tai hormonaalisten hedelmällisyysongelmien hoitoon. Aiheen tutkimista tulisi tästä syystä jatkaa tulevaisuudessakin.

## Kirjallisuus

- Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Croft, C. S. & Payne, D. W. (1989) Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* **264**:11591–11597.
- Bain, C. C. & MacDonald, A. S. (2022) The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: Diversity in the face of adversity. *Mucosal Immunol* **15**:223–234.
- Bijnen, M. & Bajénoff, M. (2021) Gland Macrophages: Reciprocal Control and Function within Their Niche. *Trends Immunol* **42**:120–136.
- Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. (2020) Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* **52**:957–970.
- Bliss, S. P., Navratil, A. M., Xie, J. & Roberson, M. S. (2010) GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol* **31**:322–340.
- Brannstrom, M., Pascoe, V., Norman, R. J. & McClure, N. (1994) Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril* **61**:488–495.
- Ciccione, N. A. & Kaiser, U. B. (2009) The biology of gonadotroph regulation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **16**:321–327.
- Cullingford, D. J., Siafarikas, A. & Choong, C. S. (2000) Genetic Etiology of Congenital Hypopituitarism. Teoksessa K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, ... D. P. Wilson (Toim.), *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586145/>
- De Torre-Minguela, C., Barberà-Cremades, M., Gómez, A. I., Martín-Sánchez, F. & Pelegrín, P. (2016) Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. *Sci Rep* **6**:22586.
- DeFalco, T., Potter, S. J., Williams, A. V., Waller, B., Kan, M. J. & Capel, B. (2015) Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. *Cell Rep* **12**:1107–1119.
- Devnath, S. & Inoue, K. (2008) An Insight to Pituitary Folliculo-Stellate Cells. *J Neuroendocrinol* **20**:687–691.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L. & Falzoni, S. (2017) The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **47**:15–31.

- Dolfi, B., Gallerand, A., Firulyova, M. M., Xu, Y., Merlin, J., Dumont, A., ... Ivanov, S. (2022) Unravelling the sex-specific diversity and functions of adrenal gland macrophages. *Cell Rep* **39**:110949.
- Duncan, W. C., Rodger, F. E. & Illingworth, P. J. (1998) The human corpus luteum: Reduction in macrophages during simulated maternal recognition of pregnancy. *Hum Reprod* **13**:2435–2442.
- Fan, X. & Rudensky, A. Y. (2016) Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* **164**:1198–1211.
- Fanis, P., Neocleous, V., Papapetrou, I., Phylactou, L. A. & Skordis, N. (2023) Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (GnRHR) and Hypogonadotropic Hypogonadism. *Int J Mol Sci* **24**:15965.
- Fauquier, T., Guérineau, N. C., McKinney, R. A., Bauer, K. & Mollard, P. (2001) Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci* **98**:8891–8896.
- Fauquier, T., Lacampagne, A., Travo, P., Bauer, K. & Mollard, P. (2002) Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab* **13**:304–309.
- Félix, I., Jokela, H., Karhula, J., Kotaja, N., Savontaus, E., Salmi, M. & Rantakari, P. (2021) Single-Cell Proteomics Reveals the Defined Heterogeneity of Resident Macrophages in White Adipose Tissue. *Front Immunol* **12**:719979.
- Gal-Oz, S. T., Maier, B., Yoshida, H., Seddu, K., Elbaz, N., Czysz, C., ... Shay, T. (2019) ImmGen report: Sexual dimorphism in the immune system transcriptome. *Nat Commun* **10**:4295.
- Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E. & Van Rooijen, N. (1994) Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J Androl* **15**:558–564.
- Gharib, S. D., Wierman, M. E., Shupnik, M. A. & Chin, W. W. (1990) Molecular Biology of the Pituitary Gonadotropins. *Endocr Rev* **11**:177–199.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* **330**:841–845.
- Ginhoux, F. & Williams, M. (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**:439–449.
- Gordon, S. (2008) Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *Eur J Immunol* **38**:3257–3264.
- Guerra-Silveira, F. & Abad-Franch, F. (2013) Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. *PLoS ONE* **8**:e62390.

- Gupta, P., Mahapatra, A., Suman, A. & Kumar Singh, R. (2021) Effect of Endocrine Disrupting Chemicals on HPG Axis: A Reproductive Endocrine Homeostasis. Teoksessa H. Massoud Heshmati (Toim.), *Hot Topics in Endocrinology and Metabolism*. IntechOpen.
- Han, J., Fan, Y., Zhou, K., Blomgren, K. & Harris, R. A. (2021) Uncovering sex differences of rodent microglia. *J Neuroinflammation* **18**:74.
- Ho, Y., Hu, P., Peel, M. T., Chen, S., Camara, P. G., Epstein, D. J., ... Liebhaber, S. A. (2020) Single-cell transcriptomic analysis of adult mouse pituitary reveals sexual dimorphism and physiologic demand-induced cellular plasticity. *Protein Cell* **11**:565–583.
- Hodson, D. J., Schaeffer, M., Romanò, N., Fontanaud, P., Lafont, C., Birkenstock, J., ... Mollard, P. (2012) Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nat Commun* **3**:605.
- Hoeffel, G. & Ginhoux, F. (2015) Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol* **6**.
- Hoeffel, G. & Ginhoux, F. (2018) Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol* **330**:5–15.
- Hume, D. A., Halpin, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:4174–4177.
- Hutson, J. C. (2006) Physiologic Interactions Between Macrophages and Leydig Cells. *Exp Biol Med* **231**:1–7.
- Jenkins, S. J. & Allen, J. E. (2021) The expanding world of tissue-resident macrophages. *Eur J Immunol* **51**:1882–1896.
- Jokela, H., Lokka, E., Kiviranta, M., Tyystjärvi, S., Gerke, H., Elima, K., ... Rantakari, P. (2020) Fetal-derived macrophages persist and sequentially mature in ovaries after birth in mice. *Eur J Immunol* **50**:1500–1514.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A. & Littman, D. R. (2000) Analysis of Fractalkine Receptor CX<sub>3</sub>CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol* **20**:4106–4114.
- Jurberg, A. D., Cotta-de-Almeida, V., Temerozo, J. R., Savino, W., Bou-Habib, D. C. & Riederer, I. (2018) Neuroendocrine Control of Macrophage Development and Function. *Front Immunol* **9**:1440.
- Jäppinen, N., Félix, I., Lokka, E., Tyystjärvi, S., Pynttari, A., Lahtela, T., ... Salmi, M. (2019) Fetal-derived macrophages dominate in adult mammary glands. *Nat Commun* **10**:281.

- Kawamura, H., Kawamura, T., Kanda, Y., Kobayashi, T. & Abo, T. (2012) Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology* **136**:448–458.
- Klein, J. R. & Wang, H.-C. (2004) Characterization of a novel set of resident intrathyroidal bone marrow-derived hematopoietic cells: Potential for immune-endocrine interactions in thyroid homeostasis. *J Exp Biol* **207**:55–65.
- Kosteli, A., Sgaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R. & Ferrante, A. W. (2010) Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* **120**:3466–3479.
- Larkin, S. & Ansorge, O. (2000) Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland. Teoksessa K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, ... D. P. Wilson (Toim.), *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425703/>
- Le Tissier, P. R., Hodson, D. J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M. & Mollard, P. (2012) Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* **33**:252–266.
- Lehtonen, H., Jokela, H., Hofmann, J., Tola, L., Mehmood, A., Ginhoux, F., ... Rantakari, P. (2025) Early precursor-derived pituitary gland tissue-resident macrophages play a pivotal role in modulating hormonal balance. *Cell Rep* **44**:115227.
- Lokka, E., Lintukorpi, L., Cisneros-Montalvo, S., Mäkelä, J.-A., Tyystjärvi, S., Ojasalo, V., ... Salmi, M. (2020) Generation, localization and functions of macrophages during the development of testis. *Nat Commun* **11**:4375.
- McClelland, E. E. & Smith, J. M. (2011) Gender Specific Differences in the Immune Response to Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **59**:203–213.
- Mechnikov, I. I. (1988) Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev Infect Dis* **10**:223–227.
- Meinhardt, A., Dejuq-Rainsford, N. & Bhushan, S. (2022) Testicular macrophages: Development and function in health and disease. *Trends Immunol* **43**:51–62.
- Min, J. Y., Park, M. H., Lee, J. K., Kim, H. J. & Park, Y. K. (2009) Gonadotropin-Releasing Hormone Modulates Immune System Function via the Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway in Murine Raw264.7 Macrophages. *Neuroimmunomodulation* **16**:177–184.
- Molitch, M. E. (2012) Anterior Pituitary. Teoksessa *Goldman's Cecil Medicine* (ss. 1431–1444). Elsevier.
- Montesinos, M. D. M. & Pellizas, C. G. (2019) Thyroid Hormone Action on Innate Immunity. *Front Endocrinol* **10**:350.

- Mulvaney, J. M., Zhang, T., Fewtrell, C. & Roberson, M. S. (1999) Calcium Influx through L-type Channels Is Required for Selective Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase by Gonadotropin-releasing Hormone. *J Biol Chem* **274**:29796–29804.
- Munro, D. A. D. & Hughes, J. (2017) The Origins and Functions of Tissue-Resident Macrophages in Kidney Development. *Front Physiol* **8**:837.
- Nes, W. D., Lukyanenko, Y. O., Jia, Z. H., Quideau, S., Howald, W. N., Pratum, T. K., ... Hutson, J. C. (2000) Identification of the Lipophilic Factor Produced by Macrophages That Stimulates Steroidogenesis\*. *Endocrinology* **141**:953–958.
- Oakley, O. R., Kim, H., El-Amouri, I., Patrick Lin, P.-C., Cho, J., Bani-Ahmad, M. & Ko, C. (2010) Periovarian Leukocyte Infiltration in the Rat Ovary. *Endocrinology* **151**:4551–4559.
- Ooi, G. T., Tawadros, N. & Escalona, R. M. (2004) Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol* **228**:1–21.
- Palis, J. & Yoder, M. C. (2001) Yolk-sac hematopoiesis. *Exp Hematol* **29**:927–936.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., ... Gross, C. T. (2011) Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* **333**:1456–1458.
- Perrotta, C., Buldorini, M., Assi, E., Cazzato, D., De Palma, C., Clementi, E. & Cervia, D. (2014) The Thyroid Hormone Triiodothyronine Controls Macrophage Maturation and Functions. *Am J Pathol* **184**:230–247.
- Rehman, A., Pacher, P. & Haskó, G. (2021) Role of Macrophages in the Endocrine System. *Trends Endocrinol Metab* **32**:238–256.
- Rosso, L. & Mienville, J. (2009) Pituitary modulation of neurohormone output. *Glia* **57**:235–243.
- Rotondo, J. C., Mazziotta, C., Lanzillotti, C., Stefani, C., Badiale, G., Campione, G., ... Tognon, M. (2022) The Role of Purinergic P2X7 Receptor in Inflammation and Cancer: Novel Molecular Insights and Clinical Applications. *Cancers* **14**:1116.
- Sasaki, F. & Iwama, Y. (1988) Correlation of Spatial Differences in Concentrations of Prolactin and Growth Hormone Cells with Vascular Pattern in the Female Mouse Adenohypophysis\*. *Endocrinology* **122**:1622–1630.
- Schally, A. V. (1970) Hypothalamic regulation of FSH and LH secretion. *Res Reprod* **2**:2–3.
- Schulz, C., Perdiguerro, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., ... Geissmann, F. (2012) A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. *Science* **336**:86–90.
- Scott, C. L. & Williams, M. (2018) The role of Kupffer cells in hepatic iron and lipid metabolism. *J Hepatol* **69**:1197–1199.

- Sheng, J. A., Bales, N. J., Myers, S. A., Bautista, A. I., Roueifar, M., Hale, T. M. & Handa, R. J. (2021) The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Front Behav Neurosci* **14**:601939.
- Stamatiades, G. A. & Kaiser, U. B. (2018) Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **463**:131–141.
- Stojilkovic, S. S., Bjelobaba, I. & Zemkova, H. (2017) Ion Channels of Pituitary Gonadotrophs and Their Roles in Signaling and Secretion. *Front Endocrinol* **8**:126.
- Stojilkovic, S. S., Tabak, J. & Bertram, R. (2010) Ion Channels and Signaling in the Pituitary Gland. *Endocr Rev* **31**:845–915.
- Stojilkovic, S. S., Tomić, M., Koshimizu, T. & Van Goor, F. (2000) Calcium Ions as Intracellular Messengers. Teoksessa P. M. Conn & A. R. Means (Toim.), *Principles of Molecular Regulation* (ss. 149–185). Totowa, NJ: Humana Press.
- Sun, H., Sun, C., Xiao, W. & Sun, R. (2019) Tissue-resident lymphocytes: From adaptive to innate immunity. *Cell Mol Immunol* **16**:205–215.
- Takey, Y. & Pearl, G. S. (1984) Ultrastructure of the human neurohypophysis. Teoksessa P. M. Motta (Toim.), *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissues* (ss. 77–88). Boston, MA: Springer US.
- Townson, D. H., O'Connor, C. L. & Pru, J. K. (2002) Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Distribution of Immune Cell Populations in the Bovine Corpus Luteum Throughout the Estrous Cycle. *Biol Reprod* **66**:361–366.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., ... Spits, H. (2018) Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **174**:1054–1066.
- Wall, M. J., Wigmore, G., Lopatář, J., Frenguelli, B. G. & Dale, N. (2008) The novel NTPDase inhibitor sodium polyoxotungstate (POM-1) inhibits ATP breakdown but also blocks central synaptic transmission, an action independent of NTPDase inhibition. *Neuropharmacology* **55**:1251–1258.
- Wolf, Y., Boura-Halfon, S., Cortese, N., Haimon, Z., Sar Shalom, H., Kuperman, Y., ... Jung, S. (2017) Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nat Immunol* **18**:665–674.
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. & Catterall, W. A. (2005) Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol Rev* **57**:387–395.
- Zhang, C., Yang, M. & Ericsson, A. C. (2021) Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Front Immunol* **12**:620510.

- Zhang, Z., Huang, L. & Brayboy, L. (2021) Macrophages: An indispensable piece of ovarian health. *Biol Reprod* **104**:527–538.
- Zhu, X., Lin, C. R., Prefontaine, G. G., Tollkuhn, J. & Rosenfeld, M. G. (2005) Genetic control of pituitary development and hypopituitarism. *Curr Opin Genet Dev* **15**:332–340.
- Zuk, M. (2009) The Sicker Sex. *PLoS Pathog* **5**:e1000267.
- Zumerle, S., Cali, B., Munari, F., Angioni, R., Di Virgilio, F., Molon, B. & Viola, A. (2019) Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. *Cell Rep* **27**:1-10.e4.

## **Liitteet**

### **Liite 1: Liuokset**

#### **EPICS PBS**

10x PBS 1:10 (BP399-4, Thermo Fischer Scientific) deionisoituun MQ-veteen laimennettuna

#### **EPICS I**

40 ml EPICS PBS

0,8 ml FCS

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

#### **EPICS FIX**

20 ml EPICS PBS

0,54 ml 37 % formaldehydi