

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Vananev adaptiivne immuunsüsteem ja NK-laadsed CD8⁺ T-rakud

Bakalaureusetöö

12 EAP

Hanna Merilyn Kreegipuu

Juhendajad: PhD Maarja Laos
PhD Pärt Peterson
PhD, MD Kai Kisand
PhD Arnold Kristjuhan

TARTU 2026

INFOLEHT

VANANEV ADAPTIIVNE IMMUUNSÜSTEEM JA NK-LAADSED CD8⁺ T-RAKUD

Vananedes toimuvad ulatuslikud muutused adaptiivse immuunsüsteemi rakkudes, valdavalt T-rakkude fenotüübis ja funktsioonis. Immunosenesentsi käigus võivad CD8⁺ T-rakud omandada NK-rakkudele sarnaseid omadusi, kuid nende muutuste ulatus ja tekkemehhanismid ei ole täielikult selged. Need muutused on olulised, kuna immuunsüsteemi vananemine on seotud suurema vastuvõtlikkusega infektsioonidele ja muutunud vaktsiini vastusega. Käesolevas bakalaureusetöös analüüsiti CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioonide jaotust, hinnati NK-raku markerite ekspressiooni naiivsetel T-rakkudel ja nende muutusi vananemise käigus, kasutades spektraal-voolutsütomeetrilist analüüsi ning erinevaid raku markereid. Tulemused näitasid, et vananedes väheneb naiivsete T-rakkude osakaal ning sellega seondult esineb märke nende populatsiooni säilitamisest homogeense replikatsiooni kaudu. Lisaks võib osa naiivseid CD8⁺ T-rakke omandada NK-rakkudele iseloomulikke omadusi, mis viitab vananemisega seotud muutustele T-rakkude fenotüübis ja adaptiivse ning kaasasündinud immuunsüsteemi tunnuste osalisele kattumisele.

Märksõnad: immunosenesents, CD8⁺ T-rakud, NK-laadsed T-rakud, vananemine

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

AGING ADAPTIVE IMMUNE SYSTEM AND NK-LIKE CD8⁺ T CELLS

Aging is associated with extensive changes in the adaptive immune system, predominantly affecting the phenotype and function of T cells. During immunosenescence, CD8⁺ T cells acquire NK cell-like properties, however, the extent and underlying mechanism of these changes are not fully understood. These changes are important, as immune aging is associated with increased susceptibility to infections and altered vaccine responses. The study analysed the distribution of CD8⁺ T cell subpopulations, evaluated the expression of NK cell markers on naive T cells and their changes with aging, using spectral flow cytometry and various cellular markers. The results showed that aging is associated with a decreased proportion of naive T cells, accompanied by indications of their population maintenance through homeostatic proliferation. Additionally, a subset of naive CD8⁺ T cells may acquire NK cell-like characteristics, suggesting age-related changes in T cell phenotype and partial overlap between features of the adaptive and innate immune system.

Keywords: immunosenescence, CD8⁺ T cells, NK-like T cells, aging

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Immunosenesents ehk immuunsüsteemi vananemine.....	6
1.2 Adaptiivse immuunsüsteemi vananemine.....	7
1.2.1 T-rakkude replikatiivne senesents ja tühimise involutsioon	8
1.3 CD8 ⁺ T-rakkude alampopulatsioonid ja nende muutused vananemisel.....	9
1.3.1 CD8 ⁺ T-rakkude areng ja alampopulatsioone iseloomustavad markerid.....	9
1.3.2 Naiivsed CD8 ⁺ T-rakud ja nende muutused vananemisel.....	9
1.3.3 CD8 ⁺ mälu T-rakud (TCM ja TEM)	10
1.3.4 CD8 ⁺ TEMRA rakud ja muutused vananemise käigus.....	11
1.4 NK-rakud.....	11
1.4.1 NK-rakud ja nende seos adaptiivse immuunsüsteemi T-rakkudega	11
1.4.2 NK-rakkude markerid ja aktivatsioon.....	12
1.5 NK-laadsete CD8 ⁺ T-rakkude teke vananemisel.....	13
1.6 NK-laadsete omaduste funktsionaalne roll.....	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjalid ja meetodika.....	16
2.2.1 Uuritavad ja bioloogiline materjal	16
2.2.2 Valimi kirjeldus	17
2.2.3 PBMC-de eraldamine ja säilitamine	17
2.2.4 PBMC proovide käsitlemine.....	18
2.2.5 Antikehad ja paneeli koostamine	19
2.2.6 Värvimisprotokoll	21
2.2.7 Spektraal-voolutsütomeetria ja mõõtmistingimuste optimeerimine	23
2.2.8 Statistiline analüüs	23
2.3 Tulemused ja arutelu	25
2.3.1 Raamistamise strateegia (ingl <i>gating strategy</i>) populatsioonide eristamiseks.....	25
2.3.2 Eakate naiivsete CD8 ⁺ T rakkude populatsioon väheneb ja efektormälu T-rakkude populatsioon suureneb	27
2.3.3 Eakates on RTE naiivsete CD8 ⁺ T-rakkude osakaal langenud ja perifeerselt jagunenud populatsiooni osakaal on suurenenud	27
2.3.4 Eakate naiivsetel CD8 ⁺ T-rakkudel ilmnevad NK-raku markerid.	30
2.3.5 Statistiliste meetodite-võrdlus ning töö piirangud	32
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY.....	35
TÄNUSÕNAD.....	36
KASUTATUD ALLIKAD	37
Lihtlitsents	45

KASUTATUD LÜHENDID

ADCC – antikehast sõltuv rakuline tsütotoksilisus, *antigen dependent cytotoxicity*

CMV – tsütomegaloviirus, *cytomegalovirus*

FMO – *fluorecence minus one*

GM – kasvusööde, *growth media*

KIR-retseptorid – *killer-cell immunoglobulin-like receptors*

MHC – peamine koosobivuskompleks, *major histocompatibility complex*

NCR – loomuliku tsütotoksilisuse retseptor, *natural cytotoxicity receptor*

NK-rakk – loomulik tapjarakk, *natural killer cell*

NKR – NK raku retseptor, *natural killer cell receptor*

NKT – loomulik tapja T-rakk, *natural killer T-cell*

PBMC – perifeerne vere mononukleaarne rakk, *peripheral blood mononuclear cell*

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate-buffered saline*

RB – jooksutamispuhver, *running buffer*

RPMI – RPMI rakusööde, *Roswell Park Memorial Institute (medium)*

RTE – hiljuti tütümusest väljunud rakud, *recent thymic emigrants*

SASP – senesentsiga seotud sekretoorne fenotüüp, *senescence-associated secretory phenotype*

T_{CM} – keskmälu T-rakk, *central memory T cell*

TCR – T-raku retseptor, *T cell receptor*

T_{EM} – efektormälu T-rakk, *effector memory T cell*

T_{EMRA} – terminaalselt diferentseerunud T-rakk, *terminally differentiated effector T cell*

T_N – naiivne T-rakk, *naïve T cell*

SISSEJUHATUS

Immuunosenesentsi ehk immuunsüsteemi vananemise käigus toimuvad muutused mõjutavad organismi võimet kaitsta end infektsioonide ja kasvajate vastu. Vananedes suureneb vastuvõtlikkus nakkushaigustele ning nõrgeneb vaktsiinide efektiivsus. Lisaks tõuseb krooniliste haiguste ja vähi risk ning immuunvastused muutuvad aeglasemaks ja vähem spetsiifiliseks. Muutused immuunsüsteemi vananemisel avalduvad eriti adaptiivse immuunsüsteemi T-rakkudes.

Adaptiivne immuunsüsteem tagab spetsiifilise ja mälu põhise kaitse, võimaldades organismil reageerida patogeenidele kiiremini ja efektiivsemalt. Vananemise käigus väheneb tuumusest väljuvate uute naiivsete T-rakkude hulk. Tuumuse involutsioonist tingitud T-rakkude tootmise langust vananemise jooksul kompenseeritakse inimeses osaliselt homöostaatilise rakujagunemise kaudu. See võib omakorda mõjutada T-rakkude võimet reageerida uutele antigeenidele ning vähendada immuunsüsteemi efektiivsust. Veel on kirjeldatud, et osa CD8⁺ T-rakke võib omandada NK-rakkudele sarnaseid omadusi, mille tulemusena võib T-rakuline immuunvastus sarnaneda rohkem kaasasündinud immuunsüsteemi vastusega.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida vananemisega kaasnevaid muutusi adaptiivse immuunsüsteemi CD8⁺ T-rakkudes, keskendudes nende fenotüübilistele muutustele ja NK-raku laadsete omaduste omandamisele. Eesmärgi saavutamiseks kasutati spektraalvoolutsütomeetrilist analüüsi ja erinevaid T- ja NK-raku markereid. Töö viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudi molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Immunosenesents ehk immuunsüsteemi vananemine

Immunosenesents ehk vananemisest tingitud immuunsüsteemi funktsiooni langus ja muutused immuunvastuse regulatsioonis hõlmavad nii rakusiseseid kui ka rakuväliseid protsesse (Mogilenko *et al.*, 2022). See mõjutab kaasasündinud ja adaptiivse immuunsüsteemi rakke, kuid mõned rakupopulatsioonid on vananemisele rohkem vastuvõtlikud kui teised (Liu *et al.*, 2023; Mogilenko *et al.*, 2022; Panda *et al.*, 2009). Immuunsüsteemi vananemisega seotud muutused avalduvad kõige selgemini adaptiivse immuunsüsteemi rakkudes, eriti T-rakkude seas (Liu *et al.*, 2023; Pawelec, 2002).

Immuunsüsteemi vananemise üheks iseloomulikuks tunnuseks on *inflammaging* ehk põletikvananemine. Põletikvananemine kirjeldab seisundit, mille korral esineb organismis püsiv madalatasemeline (ingl *low-grade*) krooniline süsteemne põletik ka patogeenide puudumisel (Franceschi *et al.*, 2000). See kujuneb kahjustunud biomolekulide ja rakuliste laguproduktide kuhjumisel, mis toimivad endogeensete ohusignaalidena ja hoiavad immuunsüsteemi püsivalt aktiveerituna (Liu *et al.*, 2023). Sama protsessi osana võib senesentsete immuunrakkude kuhjumine panustada põletikvananemise tekkesse. Vananedes väheneb senesentsete rakkude võime sihtmärkrakke tõhusalt kõrvaldada ja samaaegselt suureneb põletikuliste signaalmolekulide tootmine nende endi poolt, mis soodustab põletikulise keskkonna püsimist ja kahjustab ümbritsevaid kudesid (Liu *et al.*, 2023). Selle tulemusena süveneb nii kahjustunud rakkude ebapiisav eemaldamine kui ka põletikuline aktiivsus, mis viib põletikvananemise tekkeni (Liu *et al.*, 2023). Lisaks võivad vananemisega seotud epigeneetilised muutused lümfoïdorganites suurendada põletikulisi tsütokiine kodeerivate geenide transkriptsiooni, mis omakorda soodustab põletikvananemise kujunemist ja immuunvastuse nõrgenemist (Rasa *et al.*, 2022; Sidler *et al.*, 2013).

Ka latentsetel viirusinfektsioonidel on oluline mõju immuunsüsteemi vananemisele. Näiteks tsütomegaloviirus (CMV) mõjutab märkimisväärselt T-raku retseptorite mitmekesisust ehk võimet ära tunda ja kõrvaldada erinevaid haigustekitajaid. CMV soodustab viiruse spetsiifiliste T-rakkude kuhjumist ja nende püsivat aktivatsiooni, mille tulemusena väheneb immuunsüsteemi võime reageerida uutele antigeenidele (Khan *et al.*, 2002). Lisaks seostatakse CMV infektsiooni hilisdiferentseerunud CD8⁺ T-rakkude kuhjumisega (Khan *et al.*, 2002). Selliste rakkude kuhjumine võib vähendada naiivsete T-rakkude osakaalu ning suunata osa

immuunvastusest püsiva viirusinfektsiooni kontrollimisele teiste patogeenide arvelt (Khan *et al.*, 2002).

Immunosenesentsiga kaasnev immuunsüsteemi düsregulatsioon suurendab vastuvõtlikkust mitmetele vananemisega seotud haigustele. Krooniline põletik ja kõrgeenenud põletikuliste tsütokiinide tase soodustavad kardiovaskulaarsete haiguste, sealhulgas ateroskleroosi, kujunemist (Grahame-Clarke *et al.*, 2003). T-rakkude homöostaasi ja tolerantsuse muutused võivad suurendada autoimmuunhaiguste riski (Liu *et al.*, 2023; Prelog, 2006), samas kui põletikuliste tsütokiinide kõrgeenenud tase ja kiirenenud epigeneetiline vananemine on seotud neurodegeneratiivsete haiguste ja kognitiivse funktsiooni langusega (Ebbert *et al.*, 2017; Puzianowska-Kuźnicka *et al.*, 2016). T-rakkude funktsiooni langus piirab ka organismi võimet kasvajakke kontrollida, soodustades seeläbi pahaloomuliste kasvajate teket ja progresseerumist (Lian *et al.*, 2020). Lisaks suureneb eakatel vastuvõtlikkust rasketele infektsioonidele, mida on täheldatud ka eakatel COVID-19 patsientidel (Hazeldine ja Lord, 2020; Liu *et al.*, 2023). Samad immuunsüsteemi funktsiooni muutused põhjustavad ka vaktsiini vastuse nõrgenemist. On näidatud, et vaktsineerimise järel kujuneb eakatel madalam antikehade tase, antikehade neutraliseerimisvõime on vähenenud ja mälu B-rakkude teke on piiratud, mis takistab efektiivse humoraalse immuunvastuse kujunemist (Fedele *et al.*, 2022).

1.2 Adaptiivse immuunsüsteemi vananemine

Adaptiivse immuunsüsteemi vananemisega kaasnevad muutused raku populatsioonide osakaaludes, funktsioonis ja jagunemise võimes mõjutavad immuunvastuse täpsust ja efektiivsust (Hakim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2023). Need muutused avalduvad eriti T-rakkude populatsioonides, mille enneaegne vananemine võib nõrgendada immuunvastust ning soodustada ka teiste rakkude vananemist, kiirendades seeläbi organsüsteemide üldist vananemisprotsessi (Desdín-Micó *et al.*, 2020).

T-rakkude populatsioonides esinevaid muutusi saab jaotada nende tekkemehhanismide ja nendest tulenevate funktsionaalsete muutuste alusel primaarseteks ja sekundaarseteks. Primaarseteks tunnusteks arvatakse tüümuse involutsioon, mitokondri düsfunktsioon, geneetilised ja epigeneetilised muutused ning proteostaasi kadu (Mittelbrunn ja Kroemer, 2021). Sekundaarseteks tunnusteks on T-raku retseptorite (TCR; ingl *T cell receptor*) repertuaari mitmekesisuse langus, naiivsete ja mälurakkude osakaalude suhte muutus, T-rakkude senesents ning nende vähenenud võime diferentseeruda ja reageerida uutele

antigeenidele (Mittelbrunn ja Kroemer, 2021). Selle tulemusena kuhjuvad vananedes düsfunktsionaalsed senesentsed põletikulist sekretoorset profiili (SASP-laadne; ingl *senescence-associated secretory phenotype*) omavad T-rakud (Effros *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2023; Puzianowska-Kuźnicka *et al.*, 2016). Kuigi klassikaliselt kasutatakse SASP mõistet mitteimmuunrakkude senesentsi kirjeldamiseks, on ka senesentsetel T-rakkudel kirjeldatud sarnast tsütokiinide profiili, mis võib soodustada põletikvananemise püsimist. Selliseid rakke iseloomustab põletikuline fenotüüp ja senesentsiga seotud pinnamarkerite ekspressioon (Effros *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2023; Puzianowska-Kuźnicka *et al.*, 2016).

1.2.1 T-rakkude replikatiivne senesents ja tüümuse involutsioon

Eelpool kirjeldatud senesentsete T-rakkude kuhjumise üheks mehhanismiks on replikatiivne senesents. Korduv või pikaajaline antigeeni stimulatsioon viib T-rakkude ulatusliku jagunemiseni, mille tagajärel telomeerid lühenevad, väheneb kostimulatoorse molekuli CD28 ekspressioon ning suureneb põletikuliste tsütokiinide toodang (Chou ja Effros, 2013; Puzianowska-Kuźnicka *et al.*, 2016). Senesentsetele T-rakkudele on iseloomulik eelkõige põletikuliste tsütokiinide TNF α , IL-1, IL-6 ja IL-8 suurenenud tootmine ja senesentsiga seotud pinnamarkerite, nagu CD57 ja KLRG1, kõrgem ekspressioon (Effros *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2023; Puzianowska-Kuźnicka *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2021). Kirjeldatud muutused esinevad suuremal määral tsütotoksiliste CD8⁺ T-rakkude populatsioonides, mis vananevad kiiremini kui CD4⁺ T-rakud (Vallejo *et al.*, 2011). Telomeeride lühenemise tõttu on senesentsetel T-rakkudel puudulik jagunemisvõime, nende rakutsüklil on peatunud ja neil on vähenenud tundlikkus apoptoosi suhtes, mis võib omakorda soodustada selliste rakkude kuhjumist (Spaulding *et al.*, 1999).

Senesentsete T-rakkude kuhjumine seostub lisaks replikatiivsele senesentsile ka muutustega, mis kaasnevad tüümuse involutsiooniga. Tüümuse involutsiooni käigus väheneb tüümuse mass ja epiteelrakkude hulk ning tüümuse kude asendub järk-järgult rasvkoega (Tong *et al.*, 2020). Sellised muutused kujunevad mitme teguri koosmõjul, mille hulka kuuluvad erinevate kasvufaktorite (nt kasvuhormoonide IGF-1 ja KGF-1) taseme langus, krooniline stress, infektsioonid ning rasvumine (Calder *et al.*, 2011; Rezzani *et al.*, 2014). Tüümuse involutsioon mõjutab negatiivselt ka T-rakkude arengut, mistõttu väheneb tüümusest perifeersetesse kudedesse väljuvate naiivsete T-rakkude hulk (RTE, ingl *recent thymic emigrants*) (Lynch *et al.*, 2009).

Tekkinud puudujäägi kompenseerimiseks toimub perifeerias T-rakkude homöostaatiline rakujagunemine, mis aitab säilitada küll T-rakkude koguarvu, kuid viib mälu T-rakkude osakaalu suurenemiseni (Rodriguez *et al.*, 2021; Surh ja Sprent, 2000). Koos püsiva antigeense stimulatsiooniga soodustab see hilisdiferentseerunud ja oligoklonaalsete T-rakkude kuhjumist ning T-raku retseptorite mitmekesisuse vähenemist (Rodriguez *et al.*, 2021). Need muutused on eriti väljendunud tsütotoksiliste T-rakkude populatsioonis (Rodriguez *et al.*, 2021).

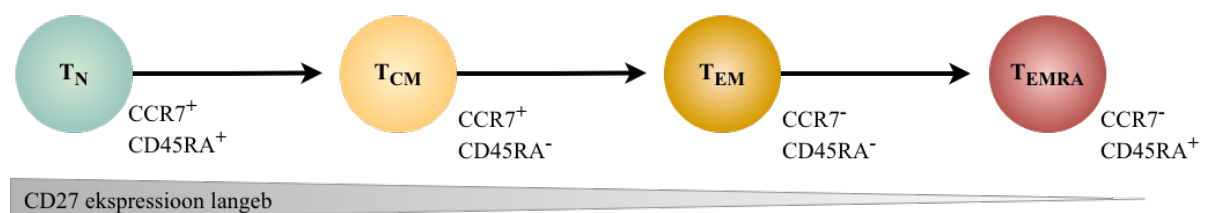
1.3 CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioonid ja nende muutused vananemisel

1.3.1 CD8⁺ T-rakkude areng ja alampopulatsioone iseloomustavad markerid

CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioonide klassikaline jaotus põhineb pinnamarkerite CD45RA ja CCR7 kombinatsioonil, mis võimaldab määratleda T-rakkude diferentseerumisastet (Van Aalderen *et al.*, 2021). CD45RA⁺CCR7⁺ rakud defineeritakse kui naiivsed T-rakud, CD45RA⁺CCR7⁻ rakud kui terminaalset diferentseerunud efektorrakud ehk T_{EMRA} rakud, CD45RA⁻CCR7⁺ rakud kui tsentraalse mälu T-rakud (T_{CM}) ja CD45RA⁻CCR7⁻ rakud kui efektormälu T-rakud (T_{EM}) (Van Aalderen *et al.*, 2021) (joonis 1).

Lisaks klassikalistele markeritele, nagu CCR7, kasutatakse T-rakkude diferentseerumise ja funktsionaalse seisundi iseloomustamiseks ka teisi pinnamarkereid, sealhulgas CD27, mille ekspressioon langeb küpsemise käigus ning peegeldab rakkude diferentseerumisastet (Van Aalderen *et al.*, 2021). Seetõttu võib CD27 kasutada alampopulatsioonide määratlemisel alternatiivse markerina CCR7 puudumisel (Van Aalderen *et al.*, 2021).

CD3⁺CD8⁺ T-raku diferentseerumine



Joonis 1. CD8⁺ T-rakkude diferentseerumine ja alampopulatsioonide jaotus pinnamarkerite alusel. Näidatud on naiivsed T-rakud (T_N), tsentraalse mälu T-rakud (T_{CM}), efektormälu T-rakud (T_{EM}) ja terminaalset diferentseerunud efektor T-rakud (T_{EMRA}). Joonis on koostatud töö autori poolt diagrams.net (draw.io) keskkonnas ning põhineb Van Aalderen *et al.* (2021).

1.3.2 Naiivsed CD8⁺ T-rakud ja nende muutused vananemisel

Naiivsed CD8⁺ T-rakud on veres ja lümfisõlmedes ringlevad tsütotoksiliste T-lümfotsüütide eellasrakud, mis ei ole veel kokku puutunud spetsiifilise antigeeniga (Goronzy *et al.*, 2015).

Tänu oma laiale T-raku retseptorite (TCR) repertuaarile võimaldavad nad immuunsüsteemil reageerida uutele antigeenidele (Lee *et al.*, 2023). Tsütokiinide vahendusel aktiveerunud naiivsed CD8⁺ T-rakud prolifereruvad ning diferentseeruvad efektor- ja mälu T-rakkudeks, mis seejärel migreeruvad lümfoïdkoest perifeersetesse kudedesse (Goronzy *et al.*, 2015).

Vananemise käigus kompenseeritakse naiivsete CD8⁺ T-rakkude populatsiooni vähenemist osaliselt homöostaatilise proliferatsiooni teel, kuid see viib TCR repertuaari mitmekesisuse languseni (Lee *et al.*, 2023). Vananemisega kaasnev T-raku retseptorite mitmekesisuse vähenemine piirab aga T-rakkude võimet reageerida uutele antigeenidele, suurendab vastuvõtlikkust infektsioonidele ning vähendab vaktsiinivastuse efektiivsust (Mogilenko *et al.*, 2022; Mittelbrunn ja Kroemer, 2021).

1.3.3 CD8⁺ mälu T-rakud (TCM ja TEM)

Aktiveerumise järgselt diferentseeruvad naiivsed CD8⁺ T-rakud mälu T-rakkudeks, et tagada korduval kokkupuutel sama antigeeniga kiirem vastus (Uibo *et al.*, 2024, pp. 41-45). Mälu T-rakud jagunevad omakorda efektormälu T-rakkudeks (T_{EM}, ingl *effector memory T cell*) ja tsentraalse mälu T-rakkudeks (T_{CM}, ingl *central memory T cell*).

Tsentraalsed mälu T-rakud (T_{CM}) paiknevad peamiselt sekundaarsetes lümfoïdorganites, neid iseloomustab kõrge jagunemisvõime ja võime diferentseeruda efektorrakkudeks, tagades pikaajalise immuunmälu säilimise (Uibo *et al.*, 2024, pp. 41-45). Efektormälu T-rakud (T_{EM}) ringlevad perifeerses veres ja migreeruvad mittelumfoïdsetesse kudedesse, kus nad vahendavad efektorfunktsioone, nagu tsütokiinide tootmine ja tsütotoksiline aktiivsus.

Pikaajaline või korduv antigeeni stimulatsioon, näiteks krooniliste infektsioonide korral, soodustab mälu T-rakkude diferentseerumist efektorfunktsiooniga rakkudeks, mille tulemusena suureneb T_{EM} ja terminaalset diferentseerunud T_{EMRA} rakkude osakaal (Mittelbrunn ja Kroemer, 2021). Samas võib pidev stimulatsioon viia T-rakkude funktsionaalse kurnatuseni, mida iseloomustab piiratud jagunemisvõime ja põletikuliste tsütokiinide produktsiooni ning inhibeerivate retseptorite ekspressiooni suurenemine (Mittelbrunn ja Kroemer, 2021). Sellised muutused piiravad T-rakkude võimet vananemise käigus tõhusalt patogeenidele reageerida ning on seotud immuunvastuse nõrgenemisega.

1.3.4 CD8⁺ TEMRA rakud ja muutused vananemise käigus

TEMRA rakud on terminaalset diferentseerunud efektormälu CD8⁺ T-rakud, mida iseloomustab CD45RA re-ekspressioon ja mis kujunevad välja korduva või pikaajalise antigeeni stimulatsiooni tulemusena (Wang *et al.*, 2024). TEMRA rakud on kõrge tsütotoksilise potentsiaaliga ning võimelised kiiresti kõrvaldama sihtmärkrakke, sekreteerides tsütotoksilisi molekule nagu perforiini ja gransüüme (Uibo *et al.*, 2024, pp. 55-56). Samas on nende rakkude jagunemisvõime piiratud ning TEMRA rakkude kuhjumist seostatakse funktsionaalse kurnatuse või rakulise senesentsiga (Callender *et al.*, 2018).

Vanemisega kaasneva TEMRA rakkude kuhjumise üheks põhjuseks peetakse latentseid viirusinfektsioone, nagu CMV infektsioon (Wang *et al.*, 2024; Mittelbrunn ja Kroemer, 2021). Lisaks soodustavad naiivsete CD8⁺ T-rakkude populatsiooni vähenemine ja korduv antigeeni stimulatsioon kõrgelt diferentseerunud CD8⁺ T-rakkude kuhjumist, millel võivad esineda ka loomulikele tapjarakkudele (NK-rakud; ingl *natural killer cell*) iseloomulikud omadused (Pereira *et al.*, 2020; Rodriguez *et al.*, 2021). Kirjeldatud T-raku populatsioonide nihe terminaalset diferentseerunud fenotüübi suunas piirab immuunsüsteemi võimet reageerida uutele antigeenidele (Mittelbrunn ja Kroemer, 2021).

1.4 NK-rakud

1.4.1 NK-rakud ja nende seos adaptiivse immuunsüsteemi T-rakkudega

Lisaks eelpool mainitud muutustele on vanemise käigus täheldatud ka T-rakkude funktsionaalset ümberkujundamist, mille tulemusena võivad nad omandada kaasasündinud immuunsüsteemi rakkudele iseloomulikke omadusi. Näiteks on teatud T-rakkude alampopulatsioonides kirjeldatud NK-rakkudele omaseid tsütotoksilisi mehhanisme ja retseptoreid (Koh *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2020). Selliste tunnuste ilmnemist on valdavalt kirjeldatud terminaalset diferentseerunud CD8⁺ T-rakkudel (Pereira *et al.*, 2020), kuid eakate CD8⁺ T-rakkude transkriptoomi analüüs näitab, et NK-rakkudele omaste markerite ekspressiooni võib esineda ka naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel (avaldamata andmed).

NK-rakud on kaasasündinud immuunsüsteemi tsütotoksilised lümfotsüüdid, millel on võime tappa kasvaja või viirusega nakatunud rakke ilma eelneva antigeenispetsiifilise aktivatsioonita (Uibo *et al.*, 2024, pp. 36-37).

NK-rakud tuvastavad rakke, mille pinnal on vähenenud või puudub MHC klass I molekul, mida kirjeldatakse “*missing self*” hüpoteesina (Kärre *et al.*, 1986). Erinevalt NK-rakkudest aktiveeruvad CD8⁺ T-rakud siis, kui TCR tunneb ära MHC I molekulil esitatud peptiidi (Uibo *et al.*, 2024). NK-rakkudel aga seonduvad MHC I molekulidega inhibeerivad retseptorid (näiteks KIR ja NKG2A/CD94) ning edastavad pidurdavat signaali, mis takistab normaalsete rakkude hävitamist (Moretta ja Moretta, 1997). Seejuures ei ole antigeeni spetsiifilisus NK-rakkude aktivatsiooni seisukohalt määrav, kuna aktivatsioon sõltub aktiveerivate ja pidurdavate signaalide tasakaalust (Uibo *et al.*, 2024). Vaatamata erinevale sihtmärgi äratundmise mehhanismile on NK-rakkude ja tsütotoksiliste CD8⁺ T-rakkude efektor mehhanismid sarnased, kuna mõlemad rakutüübid hävitavad sihtmärkrakke tsütotoksiliste graanulite vahendusel, mis sisaldavad perforiini ja gransüüme (Chen *et al.*, 2024). Nende rakupopulatsioonide tsütotoksiliste mehhanismide erinevused ja sarnasused loovad funktsionaalse seose kaasasündinud ja adaptiivse immuunsuse vahel (Chen *et al.*, 2024).

Lisaks tsütotoksilisele funktsioonile osalevad NK-rakud rakulistes vananemisprotsessides ja rakkude senesentsis ning autoimmuunsuse regulatsioonis, soodustades kudede taastamist pideva TGFβ sekretsiooni kaudu (Chen *et al.*, 2024). TGFβ takistab T-rakkude jagunemist ja tsütotoksilist aktiivsust, aidates seeläbi suruda alla liiga tugevat põletikulist vastust (Chen *et al.*, 2024).

1.4.2 NK-rakkude markerid ja aktivatsioon

NK-rakke iseloomustab adhesioonimolekuli CD56 ekspressioon ning CD3 ekspressiooni puudumine (Chen *et al.*, 2024). CD56 ekspressiooni taseme alusel jaotatakse NK-rakud kaheks alampopulatsiooniks: CD56^{dim} rakud, mis on peamiselt tsütotoksilised, ja CD56^{bright} rakud, mis toodavad tsütokiine ja omavad immuunmoduleerivat rolli (Chen *et al.*, 2024). Enamik CD56^{dim} NK-rakke ekspresseerib ka CD16 (FcγRIIIa) retseptorit, mis vahendab antikehast sõltuvat rakulist tsütotoksilisust (ingl *antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC), luues funktsionaalse seose kaasasündinud ja adaptiivse immuunsüsteemi vahel (Chen *et al.*, 2024). Teatud stimulatsiooni tingimustes võivad ka antigeeniga kokku puutunud CD8⁺ T-rakud hakata ekspresseerima CD16 retseptorit, omandades seeläbi NK-rakkudele sarnaseid funktsionaalseid omadusi (Clémenceau *et al.*, 2011). Lisaks kasutatakse NK-raku fenotüübilise markerina CD57, mille ekspressioon suureneb peamiselt hilises diferentseerumisstaadiumis olevatel küpsetel NK-rakkudel ning mida seostatakse NK-rakul tugevalt tsütotoksilise fenotüübiga (Chen *et al.*, 2024).

NK-rakkude aktivatsiooni reguleerivad mitmed aktiveerivad ja pidurdavad pinnaretseptorid. Aktiveerivad retseptorid nagu NKG2C, CD337, CD336 ja CD335 (vastavad geenid nimed *KLRC2*, *NKp30*, *NKp44* ja *NKp46*) tunnevad ära stressis, viirusega nakatunud või transformeerunud rakkude ligande ning aktiveerivad tsütotoksiliste graanulite vabastamise (Chen *et al.*, 2024). Pidurdavad retseptorid nagu KIR-retseptorid (ingl *killer-cell immunoglobulin-like receptors*) ja NKG2A/CD94, tunnevad ära MHC klass I molekule ja annavad pidurdava signaali, takistades NK-rakul rünnata normaalse MHC I ekspressiooniga rakke (Moretta ja Moretta, 1997). KLRG1 vahendab pidurdavat signaali, mis piirab NK-rakkude jagunemist ja tsütotoksilist aktiivsust ning on seetõttu seotud rakkude funktsionaalse küpsuse ja senesentsiga (Zhang *et al.*, 2024). KLRG1 ekspressiooni on kirjeldatud ka T-rakkudel ja kasvajasse sisenevatel lümfotsüütidel (Zhang *et al.*, 2024). Lisaks on eakate teatud CD8⁺ T-rakkude populatsioonides täheldatud NKG2C ja NKG2A ekspressiooni (Pereira *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2024).

NK- ja T-rakkude sarnane retseptorite ja markerite ekspressioon (CD16, CD57, NKG2C, NKG2A ja KLRG1) ning tsütotoksilised mehhanismid viitavad nende rakutüüpide sarnastele toimetehhanismidele. Kusjuures tavapärastelt säilitavad need rakutüübid siiski selgelt eristatava fenotüübi, aktivatsiooni- ja toimetehhanismid.

1.5 NK-laadsete CD8⁺ T-rakkude teke vananemisel

Vananemise käigus on täheldatud, et osa CD8⁺ T-rakke omandab NK-rakkudele iseloomulikke tunnuseid, mida ei esine noorte inimeste CD8⁺ rakkudel (Pereira *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024). Need rakud kuuluvad tinglikult TCRαβ CD8⁺ T-rakkude hulka, kuid nende fenotüüp ja funktsioon muutuvad vananemise ja/või kroonilise antigeeni stimulatsiooni käigus, millega kaasneb NK-rakkudele omaste retseptorite ekspressioon ja vastavate efektor funktsioonide tugevnemine (Pereira *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024). Nende rakkude kuhjumist seostatakse samuti vananemise ja kroonilise antigeeni stimulatsiooniga (Wang *et al.*, 2024).

Siin on oluline eristada NK-raku laadseid CD8⁺ T-rakke NKT-rakkudest (ingl *NK cell like T cells*), millel on samuti nii adaptiivse kui ka kaasasündinud immuunsüsteemi tunnused (Taniguchi *et al.*, 2003). Kui NK-raku laadseid CD8⁺ T-rakud tunnevad antigeene ära klassikaliste MHC I molekulide kaudu, siis NKT-rakud tuvastavad antigeene vaid CD1d molekulide poolt esitletud lipiid- ja glükolipiidantigeenide vahendusel (Bendelac *et al.*, 1995;

Wang *et al.*, 2024). Seega ei ole antud töös käsitletavat NK-laadsed CD8⁺ T-rakud samastatavad NKT-rakkudega.

Senimaani on kirjeldatud NK-raku laadsetel CD8⁺ T-rakkudel efektor-mälu ehk terminaalset diferentseerunud fenotüüpi (Wang *et al.*, 2024). Seejuures on leitud, et nende rakkude efektorfunktsioonid ei pruugi olla otseselt sõltuvad tsütokiinidega vahendatud aktivatsioonist (Wang *et al.*, 2024). NK-laadsetele CD8⁺ T-rakkudele on iseloomulik kostimulatoorsete retseptorite CD27 ja CD28 ekspressiooni vähenemine, küpsusmarkerite CD57 ja KLRG1 ekspressiooni suurenemine ning NK-retseptorite (NKR) ekspressiooni ilmnemine (Pereira *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024).

Oluline erinevus NK-laadsete CD8⁺ T-rakkude ja NK-rakkude vahel seisneb NK-retseptorite signaalide toimetehhanismis. NK-rakkude aktivatsioon põhineb NKR-de ja tsütokiinide vahendatud signaalidel, aga CD8⁺ T-rakkudel võivad NKR-id vahendada TCR-vahendatud signaali või vahendada aktivatsioonisignaale TCR-ist sõltumatult. Inhibeerivad NK-retseptorid (näiteks KLRG1) võivad pärssida TCR aktivatsiooni (Henson *et al.*, 2009), samas kui aktiveerivad NK-retseptorid (näiteks NK2GD) võivad TCR-i signaali asendada ja kompenseerida seeläbi ka CD28 puudumist (Groh *et al.*, 2001). Seetõttu võivad NK-laadsed CD8⁺ T-rakud olla vahepealseks lüliks adaptiivse ja kaasasündinud immuunsüsteemi vahel.

1.6 NK-laadsete omaduste funktsionaalne roll

Arvatakse, et NK-raku laadsete omaduste teke CD8⁺ T-rakkudel on vajalik vananeva immuunsüsteemi sujuvaks toimimiseks (Wang *et al.*, 2024). Seda enam, et selliste populatsioonide ilmnemist on täheldatud nii tervetel kui ka kroonilise põletiku, autoimmuunhaigusega või kasvajaga eakatel (Almehmadi *et al.*, 2014; Michel *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024).

Krooniliste viirusnakkuste puhul võib NK-laadsetel CD8⁺ T-rakkudel olla nii kaitsev kui ka põletikku ja koekahjustusi soodustav mõju. Näiteks on leitud, et KIR ja NKG2A ekspressioon CD8⁺ T-rakkudel võib krooniliste viirusnakkuste korral pärssida viiruse spetsiifilise T-rakkude efektorfunktsioone ning soodustada selliste rakkude kuhjumist nakkuskoldes (Bonorino *et al.*, 2007). Samas on näidatud, et KIR-e ekspresseerivad CD8⁺ T-rakud omavad tugevamat tsütotoksilist aktiivsust ja võivad aidata HIV-nakkust kontrolli all hoida (Jin *et al.*, 2020).

Autoimmuunhaiguste puhul võivad NK-laadsed ($\text{KIR}^+\text{CD27}^{\text{low}}$) CD8^+ T-rakud pärssida liiga tugevat immuunvastust, kõrvaldades antigeene esitlevaid rakke või autoreaktiivseid T-rakke (Li *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2015). Kuigi $\text{KIR}^+\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD8}^+$ T-rakkude kuhjumine korreleerub raskema haiguskuluga, süvendab nende puudumine autoimmuunhaiguse kulgu, viidates sellele, et nende roll on kontekstist sõltuv ja vajalik immuunsüsteemi homöostaasi säilitamiseks (Li *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2015).

NK-laadsed CD8^+ T-rakud võivad olla olulised ka kasvaja vastases immuunkaitses. Vananevatel hiirtel on leitud, et NK-laadsed CD8^+ T-rakud on võimelised tapma kasvajarakke antigeenist sõltumatult ning pärssima metastaseerumist (Kakuda *et al.*, 2023).

Vananemisega kaasnevad muutused immuunsüsteemi rakupopulatsioonides mõjutavad oluliselt immuunsüsteemi talitlust. Nende muutuste kontekstis on kirjeldatud ka NK-raku laadsete CD8^+ T-rakkude teket, mida on seni uuritud peamiselt terminaaalselt diferentseerunud T-raku populatsioonides. Samas on vähe teada, kas ja millistel tingimustel võivad naiivsed CD8^+ T-rakud omandada NK-raku laadseid tunnuseid. Naiivsete T-rakkude uurimine võib aidata selgitada, kas immuunsüsteemi vananemisega seotud muutused kujunevad juba varases diferentseerumisfaasis või on pigem hilisemate ümberkorralduste tulemus, ning luua aluse nende protsesside sihipärasemaks mõjutamiseks.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli süstemaatiliselt uurida vananemisega kaasnevaid fenotüübilisi muutusi T-raku populatsioonides. Selle eesmärgi saavutamiseks võrreldi erinevate pinnamarkerite ekspressiooni tasemeid kahes uuritavas rühmas, noortel ja eakatel isikutel.

Uurimistöö teiseks eesmärgiks oli välja selgitada, kas vananemise käigus omandavad naiivsed CD8⁺ T-rakud NK-rakkudele iseloomulikke omadusi. Eesmärgi saavutamiseks analüüsiti naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel erinevate NK-raku markerite esinemist ning võrreldi nende ekspressioonitasemeid eakate ja noorte doonorite vahel.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Uuritavad ja bioloogiline materjal

Käesolev uurimistöö on osa vananemise biomarkerite uurimisele suunatud teadusprojektist, mida viiakse läbi Tartu Ülikooli Kliinikumi ja Bio- ja siirdemeditiini instituudis. Uurimistööde teostamise ajavahemik on 01.12.2017-31.05.2031.

Käesolevas töös analüüsitud bioloogiline materjal pärineb projekti raames kogutud vereproovidest. Kontrollgrupi vereproovid koguti 18-24-aastastelt tervetelt isikutelt. Eakate (≥ 65 -aastased) uuritavate vereproovid koguti Tartu Ülikooli Kliinikumi (TÜK) Sisekliinikus ja TÜK Nahahaiguste kliinikus.

Veeniverest eraldati perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC-d), mis krüokonserveeriti temperatuuril -150°C kuni edasise analüüsini. Käesolevas töös kasutatud proovid olid säilitatud ligikaudu seitse aastat enne analüüside teostamist.

Lisaks varasemalt kogutud noorte ja eakate PBMC proovidele koguti täiendavalt verd noortelt doonoritelt, et suurendada kontrollgrupi proovide arvu ning säilitada tulevikuks planeeritud katsete jaoks vajalike kindla HLA alleeliga proovid. Proovid koguti ajavahemikul 01.12.2025-03.12.2025. Kokku koguti verd 20 tervelt doonorilt vanuses 19-24 aastat.

Kõik doonorid allkirjastasid uuringus osalemiseks teadliku nõusoleku vormi. Uuring viidi läbi kooskõlas Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee loaga 368/M-4.

Värskelt kogutud noorte doonorite PBMC-sid otsustati antud töös mitte kasutada. Katsetes kasutati ainult varasemalt kogutud noorte doonorite proove, sõltumata eelnevalt määratletud valikukriteeriumist. Seda põhjusel, et eakate proovid olid pikaajaliselt krüosäilitatud (ligikaudu seitse aastat) ning erinev säilitusaeg võib mõjutada rakkude funktsionaalseid omadusi ja seeläbi mõjutada tulemuste võrreldavust.

2.2.2 Valimi kirjeldus

Uuringusse kaasati kokku 48 uuritavat, kellest 24 kuulusid kontrollgruppi ja 24 eakate gruppi. Uuritavate demograafilised andmed on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Uuringusse kaasatud uuritavate iseloomustus.

	Noored ($n=24$)	Eakad ($n=24$)
Vanuse vahemik	18–23	66–96
Keskmine vanus (SD)	20,3 (1,3)	78,4 (7,8)
Naised (%)	17 (71%)	18 (75%)
Mehed (%)	7 (29%)	6 (25%)

2.2.3 PBMC-de eraldamine ja säilitamine

Vereproovid koguti hepariini sisaldavatesse katsutitesse (5 mL; Surgitech) ning proovid töödeldi hiljemalt nelja tunni jooksul pärast kogumist. Kõik protseduurid viidi läbi laminaarkapis steriilsetes tingimustes.

PBMC-d eraldati perifeersest verest tihedusgradient-tsentrifuugimise meetodil, kasutades Ficoll-Paque lahust (Biotech). Vereproove hoiti töötlemise vältel toatemperatuuril.

Esmalt tsentrifuugiti vereproove ilma pidurita ($300 \times g$, 10 minutit, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Eraldunud plasma koguti ja säilitati temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pärast plasma eemaldamist lahjendati leukotsüütide ja trombotsüütide kiht (ingl *buffy coat*) PBS-ga (fosfaadiga puhverdatud soolalahus, ingl *phosphate-buffered saline*, Bioatlas) suhtes 1:1. PBMCde eraldamiseks pipeteeriti PBS-ga lahjendatud vereproovid ettevaatlikult Ficoll-Paque lahusele (10 mL) ning tsentrifuugiti ilma pidurita ($400 \times g$, 30 minutit, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tsentrifuugimise järel koguti plasma ja Ficoll-Paque lahuse piirilt PBMC-de kiht ning rakke pesti PBS-ga ($300 \times g$, 10 minutit, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pesu korralti RPMI söötmes (ingl *Roswell Park Memorial Institute*, Thermo Fisher Scientific).

Pärast pesu resuspendeeriti rakud sobivas mahus PBS puhvril. Rakkude loendamiseks segati 18 µl rakususpensiooni 2 µl akridiin oranži värviga (*Acridine Orange*, Logos) ning elusad rakud loendati fluorestsents-rakuloenduriga LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems), vastavalt tootja protokollile.

Rakud külmutati, lisades rakususpensioonile võrdse mahu külmutussegu, mis sisaldas 20% (v/v) dimetüülsulfoksiidi (DMSO; HNK) ja 80% (v/v) looteveise seerumit (FBS, Lanlab). Külmutamine viidi läbi kontrollitud kiirusega ($-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) kasutades Mr. Frosty™ konteinerit (Thermo Fisher Scientific) temperatuuril -80°C . Seejärel viidi külmutatud rakud pikaajaliseks säilitamiseks -150°C kappi..

Kuna varasemalt kogutud proovid olid ligikaudu seitse aastat vanad ning uued proovid oluliselt värskemad, ei kaasatud uusi proove katsetesse, et vältida võimalikke erinevusi proovide omadustes.

2.2.4 PBMC proovide käsitlemine

Külmutatud PBMC-d sulatati vahetult enne katsete läbiviimist. Selleks eemaldati krüoviaal – $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ kapist, asetati lühiajaliselt jääle ning seejärel $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni, kus viaal sulatati kiirelt.

Sulatatud rakususpensioon viidi 15 ml tsentrifuugituubi. Rakkudele lisati järk-järgult 1-2 minuti jooksul 4 ml kasvusöödet (GM), et vähendada rakkude osmootilist stressi. Pärast seda viidi rakususpensiooni maht GM-ga 10 ml-ni.

Rakususpensioon tsentrifuugiti ($200 \times g$, 10 minutit), eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti toatemperatuuril L-glutamiini, 5% FBS-i, penitsilliin-streptomütsiini ja DNase I ($20\text{ }\mu\text{g}/10\text{ ml}$) sisaldavas RPMI söötmes.

Rakkude kontsentratsioon ja eluvõimelisus määrati fluorestsentsrakuloenduriga LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems), kasutades akridiin oranži, vastavalt tootja juhiste. Pärast rakkude loendamist proovid tsentrifuugiti ($200 \times g$, 10 min) ja eemaldati supernatant. Seejärel resuspendeeriti rakud $50\text{ }\mu\text{l}$ RPMI söötmes, mis sisaldas DNase I-te ($20\text{ }\mu\text{g}/10\text{ ml}$) ja $10\text{ }\mu\text{l}$ Fc-retseptori blokeerijat, saavutades kontsentratsiooni ligikaudu 2×10^6 rakku $50\text{ }\mu\text{l}$ kohta. Fc-retseptori blokeerija lisati selleks, et vähendada antikehade mittespetsiifilist seondumist rakkude Fc-retseptoritele.

2.2.5 Antikehad ja paneeli koostamine

Käesolevas uuringus kasutati mitmest pinnamarkerist koosnevat erinevate fluorokroomidega konjugeeritud antikehade paneeli, mis võimaldas tuvastada ja fenotüübiliselt iseloomustada CD8⁺ T-rakke. Markerite paneel võimaldas hinnata nende diferentseerumisastet, aktivatsiooni, terminaalset küpsemist ja NK-laadsete tunnuste esinemist, mis on seotud vananemise ja kroonilise antigeeni stimulatsiooniga. Kasutatud antikehade loetelu ja omadused on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Spektraal voolutsütomeetria paneelis kasutatud antikehade omadused.

Antikeha	Geen	Omadus, funktsioon
Live/Dead		Elulemusmarker
TCR $\gamma\delta$	<i>TRG, TRD</i>	Mittekonventsionaalsete $\gamma\delta$ T-rakkude marker
CD3	<i>CD3E, CD3D, CD3G, CD247</i>	Pan-T-raku marker
CD4	<i>CD4</i>	Abistaja T-raku marker
CD8	<i>CD8A, CD8B</i>	Tsütotoksilise T-raku marker
CD45RA	<i>PTPRC</i>	T-raku alampopulatsiooni ja diferentseerumise marker
CCR7	<i>CD197</i>	T-raku alampopulatsiooni ja diferentseerumise marker
CD27	<i>CD27</i>	T-raku kostimulaatorne retseptor; diferentseerumise marker
CD57	<i>B3GAT1</i>	Replikatsiooni ja terminaalse diferentseerumise marker
CD38	<i>CD38</i>	Hiljuti tüümusest väljunud rakkudele iseloomulik marker
CCR9	<i>CCR9</i>	Hiljuti tüümusest väljunud rakkudele iseloomulik marker
CD7	<i>CD7</i>	T- ja NK-raku kostimulatsiooniga seotud retseptor
KLRG1	<i>KLRG1</i>	NK-raku marker; T-raku diferentseerumise ja senesentsi marker
CD335	<i>NKp46</i>	NK-raku marker
CD56	<i>NCAM</i>	NK-raku marker
NKG2C	<i>KLRC2</i>	NK-raku marker
CD94	<i>KLRD1</i>	NK-raku marker
CD16	<i>FcyRIIIa</i>	NK-raku marker
DAP12	<i>TYROBP</i>	NK-raku marker

Elulemuse hindamiseks kasutati Zombie värvi. T-rakkude tuvastamiseks kasutati CD3 antikeha ning CD8⁺ T-rakkude selekteerimiseks CD8 antikeha, samas kui CD4 ja TCR $\gamma\delta$ antikehade abil välistati vastavalt CD4⁺ ja $\gamma\delta$ T-rakud, et keskenduda TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ T-rakkudele.

CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioonide määratlemiseks kasutati CD45RA ja CCR7 markereid, mis võimaldavad eristada rakkude diferentseerumisastet. Diferentseerumisprotsessi täpsemaks

iseloomustamiseks kaasati CD27 ja CD7 markerid. CD27 kõrge ekspressioon on iseloomulik naiivsetele T-rakkudele ja võimaldab eristada varasemaid ja hilisemaid arengustaadiume (Van Aalderen *et al.*, 2021). CD7 ekspressioon on seotud diferentseerunud T-rakkudega ning kuna seda markerit ekspresseeritakse ka NK-rakkudel, võib CD7 ekspressiooni suurenemine viidata NK-laadse fenotüübi omandamisele (Hyslop *et al.*, 2025). Lisaks on näidatud, et CD7 suurendab diferentseerunud ja kurnatud T-rakkude resistentsust apoptoosi suhtes (Hyslop *et al.*, 2025).

Naiivsete CD8⁺ T-rakkude küpsusastme hindamiseks kasutati CD38 ja CCR9 markereid. Kõrge CD38 ekspressioon iseloomustab hiljuti tuumusest väljunud T-rakke (ingl *recent thymic emigrants*, RTE), mille ekspressioon väheneb rakkude küpsemise ja jagunemise käigus (Bohacova *et al.*, 2024). CD38 ekspressiooni langust on kirjeldatud ka seoses vananemisega, peegeldades tuumuse involutsiooni ja uute naiivsete T-rakkude vähenenud tootmist (Bohacova *et al.*, 2024). Ka CCR9 ekspressioon on iseloomulik RTE T-rakkudele ning väheneb küpsemise käigus, mistõttu saab seda markerit kasutada varajaste naiivsete T-rakkude alampopulatsioonide tuvastamiseks (Bohacova *et al.*, 2024).

Terminaalse diferentseerumise ja replikatiivse senesentsi hindamiseks valiti CD57 ja KLRG1 markerid. T-rakkudel kujuneb CD57 ekspressioon välja peamiselt kõrgelt diferentseerunud efektor- ja mälu T-rakkudel, tõenäoliselt korduva antigeeni stimulatsiooni tulemusena, ning sellistel rakkudel on enamasti vähenenud jagunemisvõime (Kared *et al.*, 2016). KLRG1 on NK- ja T-rakkudel ekspresseeritud pidurdav retseptor, mille ekspressioon seostub NK-rakkudes vähenenud tsütotoksilisuse ja T-rakkudes terminaalset diferentseerunud fenotüübiga (Zhang *et al.*, 2024). Seetõttu võib KLRG1 ekspressioon viidata ka NK-raku laadsete omaduste kujunemisele CD8⁺ T-rakkudes.

NK-laadsete tunnuste tuvastamiseks naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel valiti järgnevad NK-rakkudele iseloomulikud markerid KLRG1, CD56, CD16, CD94, NKG2C ja CD335. CD335 (NKP46) kuulub NK-rakkude loomuliku tsütotoksilisuse retseptorite hulka (ingl *natural cytotoxicity receptors*, NCR) ning sarnaselt NKG2C-le osaleb sihtmärkrakkude äratundmises ja NK-rakkude tsütotoksilise vastuse käivitamises (Mace, 2023; Sivori *et al.*, 1997). CD16 ja CD56 koekspressioon on klassikaliselt seotud NK-rakkude populatsioonide kindlaks määramisega, seega viitab nende ekspressioon CD8⁺ T-rakkudel NK-laadse fenotüübi omandamisele (Mace, 2023; Pereira *et al.*, 2020). Sarnaselt viitab ka CD94 ja CD56 koekspressioon NK-laadsele fenotüübile. DAP12 analüüs võimaldab hinnata NK-

retseptoritega seotud signaale, kuna tegemist on signaal-adaptervalguga, mis osaleb NK-rakkude aktivatsiooniradades (Chen *et al.*, 2024). DAP12 ekspressiooni on kirjeldatud ka NK-laadsetel CD8⁺ T-rakkudel, kuid see esineb peamiselt terminaalset diferentseerunud, mitte naiivsetes rakkudes ja vahendab NKG2D-retseptori kaudu tsütotoksilisust (Chen *et al.*, 2024; Pereira *et al.*, 2020).

2.2.6 Värvimisprotokoll

PBMC-d värviti spektraal-voolutsütomeetriliseks analüüsiks mitmes etapis, kasutades ligikaudu 2×10^6 rakku proovi kohta. Värvimine viidi läbi 96-süvendilisel plaadil, kuhu rakud jaotati eraldi süvenditesse värvimata kontrollide ja täisvärvinguga proovide jaoks. Antikehade kontsentratsioonid valiti tootja soovitude alusel ning optimeeriti eelnevate katsete käigus, et tagada optimaalne signaali intensiivsus ja vähendada fluorokroomide spektraalset kattuvust. Antikehade lõplikud mahud arvutati vastavalt värvimisreaktsiooni lõppmahule.

Kõigepealt lisati rakkudele ühekaupa kindlas järjekorras lisatavad antikehad, CCR9 ja TCR $\gamma\delta$, vastavalt tabelis 3 toodud mahtudele ning kummagi antikeha lisamise järel inkubeeriti rakke 5 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel lisati värsketele rakkudele esimene antikehasegu (segu 1, tabel 3) ning rakke inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures pimedas. Pärast inkubatsiooni tsentrifuugiti rakud ($300 \times g$, 7 min) ja pesti üks kord RB puhvril.

Elus- ja surnud rakkude eristamiseks inkubeeriti rakke 15 minutit toatemperatuuril pimedas, kasutades Zombie NIR värvi (BioLegend), vastavalt tootja juhistele.

Seejärel tsentrifuugiti rakud ($300 \times g$, 7 minutit) ning pesti RB puhvril kaks korda. Rakud fikseeriti True-Nuclear™ fikseerimispuhvril 45 minutit toatemperatuuril pimedas, vastavalt tootja juhistele. Fikseerimise järel rakud tsentrifuugiti ($300 \times g$, 7 minutit) ja pesti kaks korda RB puhvril ($400 \times g$, 7 minutit). Fikseeritud rakud resuspendeeriti FcR blokeerijat sisaldavas RB puhvril ning seejärel lisati fikseeritud rakkudele teine antikehasegu (segu 2, tabel 3). Rakke inkubeeriti üleöö 4 °C juures pimedas.

Järgmisel päeval tsentrifuugiti rakud ($400 \times g$, 7 minutit) ning pesti kaks korda tandemvärvide stabiliseerijat sisaldavas RB puhvril. Seejärel permeabiliseeriti rakud True-Nuclear™ permeabiliseerimispuhvril. Pärast permeabiliseerimist tsentrifuugiti rakud ($400 \times g$, 7 minutit) ning resuspendeeriti FcR blokeerijat sisaldavas permeabilisatsioonipuhvril. Permeabiliseerimise järel lisati rakkudele intratsellulaarse markeriga kolmas antikehasegu

(segu 3, tabel 3) ning proove inkubeeriti 4 tundi 4 °C juures pimedas. Seejärel tsentrifuugiti rakud ($400 \times g$, 7 minutit), pesti kaks korda permeabiliseerimispuhvris ning resuspendeeriti 150 µl tandemvärvide stabiliseerijat sisaldavas RB-s. Valmis proove hoiti kuni spektraalvoolutsütomeetrilise analüüsi teostamiseni pimedas.

Tabel 3. Paneelis kasutatavate antikehade segud. Välja on toodud kasutatud antikeha, selle külge konjugeeritud fluorokroom, tootja, kasutatud lahjendus ning maht proovi kohta.

	Lisamisviis	Antikeha	Fluorokroom	Tootja	Lahjendus	Maht proovi kohta (µl)
	Eraldi (1.)	CCR9	BV750	BD biosciences	1:40	2,5
	Eraldi (2.)	TCRγδ	PerCP-eFl710	Invitrogen	1:160	0,625
Segu 1	Komponent	Antikeha	Fluorokroom	Tootja	Lahjendus	Maht proovi kohta (µl)
	RPMI koos DNase I-ga	-	-	Nerbe Plus + Applichem	-	21,03
	Brilliant stain	-	-	BD biosciences	-	20
		CCR7	PE-Dazzle594	Biolegend	1:100	1
		CD38	APC-Fire810	Biolegend	1:80	1,25
		CD335	BV510	Biolegend	1:80	1,25
		CD27	AF700	Biolegend	1:40	2,5
		KLRG1	APC/Fire750	Biolegend	1:40	2,5
		CD7	BV421	Biolegend	1:640	0,16
		NKG2C	PE	Biolegend	1:320	0,31
Live/Dead	Komponent	Antikeha	Fluorokroom	Tootja	Lahjendus	Maht proovi kohta (µl)
	RB	-	-	-	-	100
		L/D	Zombie-NIR		1:1000	1
Segu 2	Komponent	Antikeha	Fluorokroom	Tootja	Lahjendus	Maht proovi kohta (µl)
	RB	-	-	-	-	28,65
	Tandem Stabilizer	-	-	Biolegend	-	0,1
	Brilliant stain	-	-	BD biosciences	-	20
		CD45RA	BV570	Biolegend	1:320	0,31
		CD56	BV650	Biolegend	1:320	0,31
		CD57	BV785	Biolegend	1:2000	0,05
		CD16	SparkBlue515	Biolegend	1:1000	0,1
		CD3	SparkBlue574	Biolegend	1:640	0,16
		CD4	SparkBlue550	Biolegend	1:640	0,16
Segu 3	Komponent	Antikeha	Fluorokroom	Tootja	Lahjendus	Maht proovi kohta (µl)
	1x Perm Buffer	-	-	Biolegend	-	50
		DAP12	APC	MACS	1:1000	0,1

2.2.7 Spektraal-voolutsütomeetria ja mõõtmistingimuste optimeerimine

Spektraal-voolutsütomeetria mõõtmised teostati voolutsütomeetril Sony ID7000 (Sony Biotechnology). Mõõtmiste teostamisel kasutati lasereid lainepikkustega 405 nm (lilla), 488 nm (sinine), 561 nm (kollakasroheline) ja 637 nm (punane). Mõõtmistingimused valiti vastavalt kasutatud fluorokroomide spektraalsetele omadustele, et tagada optimaalne signaali eristatavus ning vähendada fluorokroomide vahelist spektraalset kattuvust.

Enne lõplike mõõtmiste läbiviimist optimeeriti nii antikehade kontsentratsioonid kui ka mõõtmistingimused. Selleks viidi läbi kaks optimeerimiskatset, mille käigus testiti erinevaid antikehade kontsentratsioone ning seadme parameetreid. Optimeerimiskatsete käigus hinnati markerite signaali tugevust ja eristatavust ning valiti tingimused, mis tagasid parima signaali ja taustmüra suhte.

Optimeerimise käigus kasutati täisvärvinguga proove, värvimata kontrole, üksikvärvinguid ja FMO (ingl *Fluorescence Minus One*) kontrole, mille puhul jäeti üks marker värvimata, et hinnata taustsignaali ja positiivse ning negatiivse populatsiooni eristatavust. FMO kontrollid viidi läbi valitud markerite (CCR7, CD335, CD7, NKG2C ja DAP12) jaoks. Kompensatsiooni määramiseks kasutati UltraComp kompensatsioonikuule.

Optimeerimiskatsete tulemusena valiti edasiseks analüüsiks antikehade kontsentratsioonid, mis tagasid selge signaali eristumise. Kasutatud antikehade lahjendused on esitatud tabelis 3. Edasistes katsetes valiti mõõtmiseks järgmised detektorite signaali võimenduse (ingl *gain*) seadistused: FSC 17, SSC 5,3; 405 nm laser 5,2; 488 nm laser 5,4; 561 nm laser 5,5 ja 637 nm laser 6,3.

2.2.8 Statistiline analüüs

Kokku viidi läbi viis sõltumatut katset. Statistilisse analüüsi kaasati neist neli, kuna ühes katses puudus CD45RA signaal, mis oli vajalik naiivsete CD8⁺ T-rakkude populatsiooni määratlemiseks.

Spektraal-voolutsütomeetria tulemuste töötlemiseks kasutati SONY ID7000 tarkvara. Andmete statistiliseks analüüsiks ja visualiseerimiseks kasutati programme GraphPad Prism 11 (Graphpad software) ja Microsoft Excel (Microsoft). Rakupopulatsioonide keskmiste väärtuste võrdlemiseks noorte ja eakate vahel kasutati Mann-Whitney U-testi ja kahefaktorilist

dispersioonanalüüsi (ANOVA), et hinnata vanuse mõju rühmade vahel ja katsetevahelist varieeruvust.

Statistiliselt oluliseks loeti tulemusi, kui $p < 0,05$. Statistilise olulisuse tähistamiseks kasutati järgnevat tärnide süsteemi: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

Töö koostamise käigus kasutati ChatGPT-d (OpenAI, 2025) teksti keeleliseks toimetamiseks. Saadud väljundeid kohandati ja kontrolliti autori poolt enne töö lõplikku vormistmist.

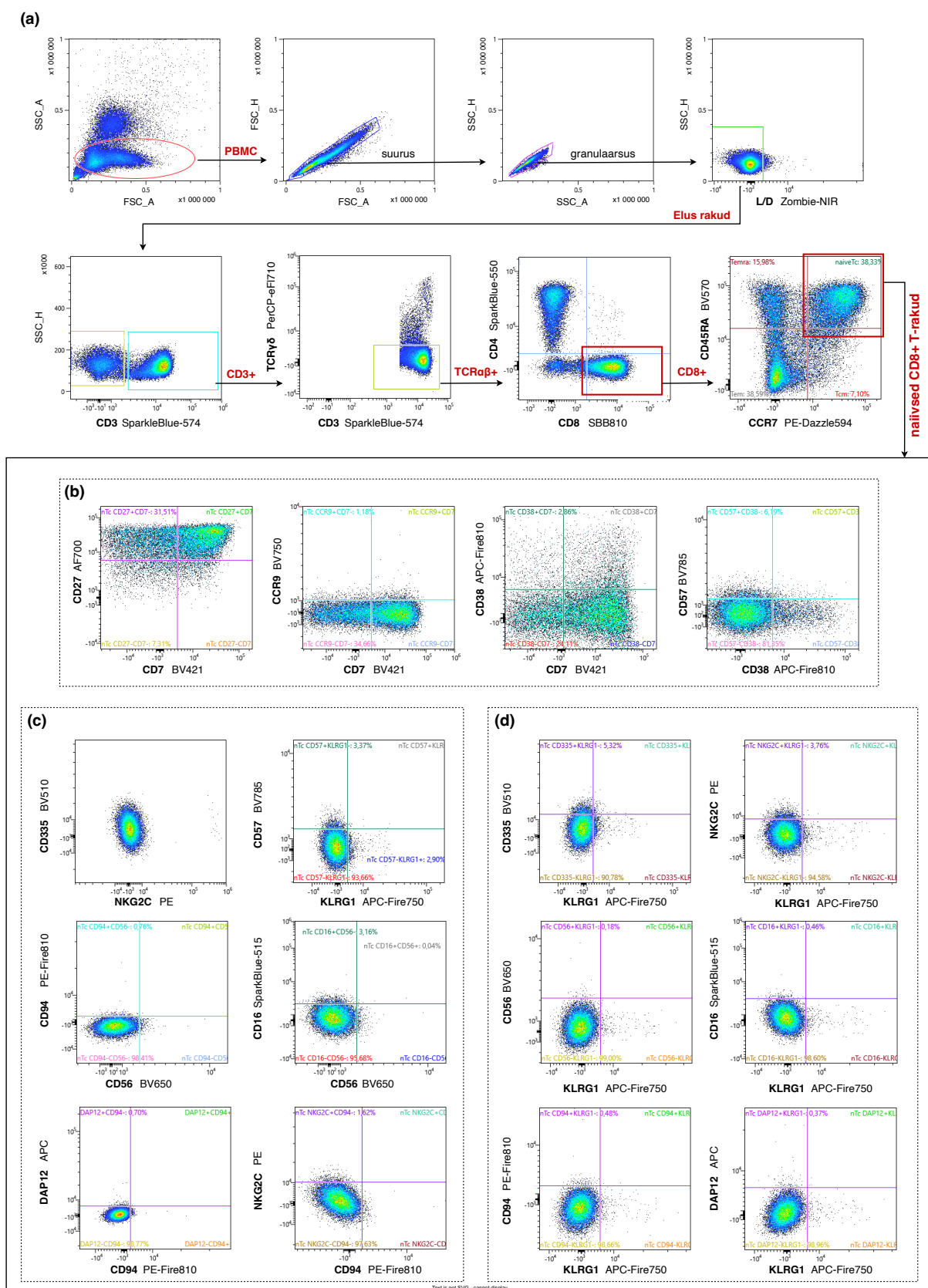
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Raamistamise strateegia (ingl *gating strategy*) populatsioonide eristamiseks

Harvaesinevate populatsioonide nagu eakate naiivsete CD8⁺ T-rakkude usaldusväärseks tuvastamiseks koguti spektraal-voolutsütomeetril iga doonori kohta keskmiselt ~480 000 sündmust noorte ja ~450 000 sündmust eakate kohordis. Markerite ekspressiooni analüüsimiseks loodud raamistamise strateegia on toodud joonisel 2.

Rakupopulatsioonide eraldamiseks rakendati hierarhilist raamistamise strateegiat, et tuvastada naiivsete CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioon ning võrrelda nende fenotüübilisi omadusi eakate ja noorte vahel. Spektraal-voolutsütomeetrilise analüüsi käigus selekteeriti esmalt rakupopulatsioonid suuruse (*forward scatter*, FSC) ja granulaarsuse (*side scatter*, SSC) alusel. Seejärel valiti elusate rakkude hulgast (Zombie-negatiivsed) CD3⁺ rakud. CD3⁺ rakkude seas valiti TCRαβ-positiivsed T-rakud (TCRγδ-negatiivsuse alusel), mille hulgast tuvastati CD4 ja CD8 markerite alusel CD8⁺ T-rakud. Edasise analüüsi jaoks saadi nii noorte proovides keskmiselt ligikaudu 48 000 ja eakate proovides ligikaudu 32 000 CD8⁺ T-rakku. CD8⁺ T-rakud jaotati alampopulatsioonidesse CD45RA ja CCR7 (ühes katses CD27) ekspressiooni alusel. Edasine analüüs viidi läbi noorte ja eakate naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel.

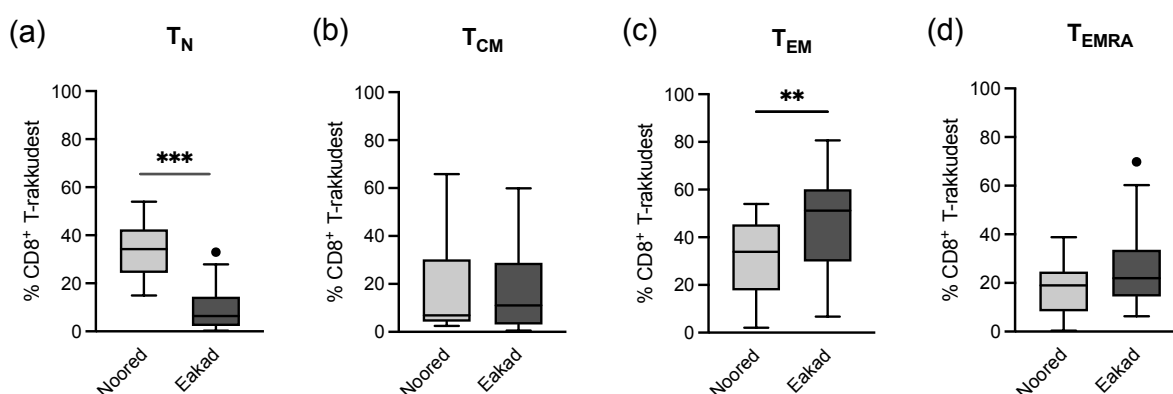
Naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel analüüsiti erinevate T ja NK-raku markerite ekspressiooni (toodud tabelis 2). CD8⁺ T-rakkude diferentseerumisastme ja küpsuse hindamiseks kasutati markereid CD27, CD7, CCR9, CD57 ja CD38 (joonis 2b). Terminaalse diferentseerumise ja replikatiivse senesentsi hindamiseks analüüsiti naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel CD57 ja KLRG1 ekspressiooni (joonis 2c). NK-rakkudele iseloomulike markerite, sealhulgas KLRG1, CD56, CD16, CD94, DAP12, NKG2C ja CD335, ekspressiooni analüüs võimaldas hinnata NK-laadsete tunnuste esinemist CD8⁺ T-rakkudes (joonis 2c). Täiendavalt tehti lisaraam CD94 koos NKG2C-ga, et hinnata NK-rakule iseloomulikku aktiveerivat telge, ning lisaraamid KLRG1-ga, et analüüsida selle koekspressiooni teiste NK-raku markeritega (CD335, CD56, CD16, NKG2C, CD94 ja DAP12) (joonis 2c-d).



Joonis 2. Spektraal-voolutsütomeetria raamistamise strateegia. (a) Naiivsete CD8⁺ T-rakkude identifitseerimine, (b) T-rakkude üldised aktivatsiooni ja diferentseerumise markerid, (c) NK-raku markerid ja (d) KLRG1 koekspressioon NK-raku markeritega naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel.

2.3.2 Eakate naiivsete CD8⁺ T rakkude populatsioon väheneb ja efektormälu T-rakkude populatsioon suureneb

CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioonide jaotuse analüüs näitas, et eakatel oli naiivsete rakkude osakaal võrreldes noortega madalam (joonis 3a). Efektormälu rakkude osakaal oli eakatel kõrgem (joonis 3c). Keskmälu ja terminaalselt diferentseerunud rakkude osakaalus noorte ja eakate vahel statistiliselt olulist erinevust ei täheldatud, kuid eakatel ilmne suundumus terminaalselt diferentseerunud rakkude suuremale osakaalule (joonis 3b,d).



Joonis 3. CD8⁺ T-rakkude alampopulatsioonide võrdlus noorte ja eakate vahel. (a) Naiivsed (T_N), (b) keskmälu (T_{CM}), (c) efektormälu (T_{EM}) ja (d) terminaalselt diferentseerunud (T_{EMRA}) CD8⁺ T-rakud. Populatsioonide suurus on esitatud protsendina CD8⁺ T-rakkudest. Kastdiagrammid kujutavad mediaani ja kvartiilide vahemikku (IQR). Statistiline olulisus määrati Mann-Whitney U-testiga (GraphPad Prism).

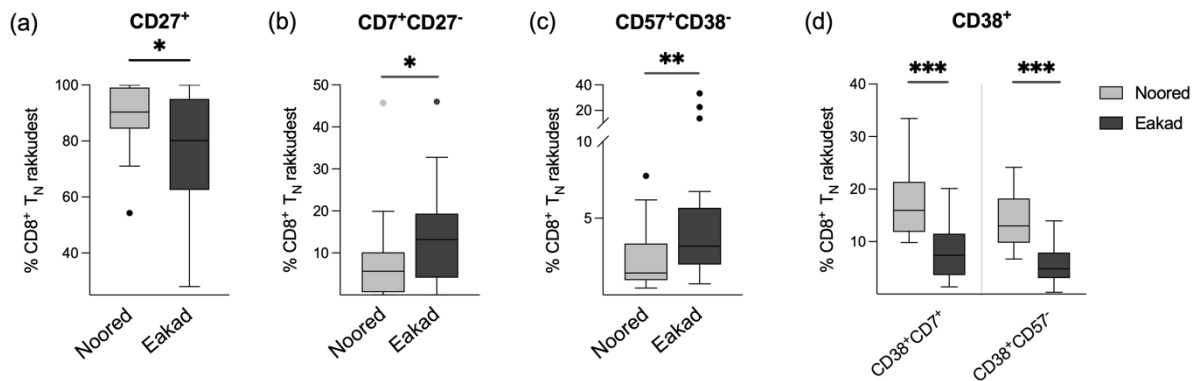
Antud tulemused on kooskõlas varasemate uuringutega, mis on näidanud, et vananemise käigus naiivsete T-rakkude populatsioon väheneb ning rohkem diferentseerunud T-rakkude mälu alampopulatsioonid suurenevad.

2.3.3 Eakates on RTE naiivsete CD8⁺ T-rakkude osakaal langenud ja perifeerselt jagunenud populatsiooni osakaal on suurenenud

Edasi analüüsiti naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel T-rakule iseloomulike pinnamarkerite (CCR9, CD7, CD27, CD38, CD57) ekspressiooni, et hinnata rakkude diferentseerumise ja aktivatsiooni seisundit (joonis 2b).

Diferentseerumismarkeri CD27 ekspressioon oli eakatel madalam võrreldes noortega (joonis 4a). CD27 koekspressiooni analüüsil CD7-ga ei tuvastatud vanuserühmade vahel erinevusi ei CD27⁺CD7⁺ ega CD27⁺CD7⁻ rakupopulatsioonides. Markeri ekspressiooni langus naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel avaldus ainult CD27⁺ populatsioonide koondanalüüsis. CD27 ekspressiooni langus eakatel viitab nende naiivsete CD8⁺ T-rakkude nihkumisele varasest

diferentseerumisastmest rohkem diferentseerunud olekusse. Kuna CD27 on iseloomulik naiivsetele ja varastele mälu-rakkudele, võib CD27 ekspressiooni vähenemine viidata korduvale homöostaatilisele proliferatsioonile, mille abil kompenseeritakse perifeerias uute naiivsete CD8⁺ T-rakkude juurdevoolu vähenemist (Pereira *et al.*, 2020).



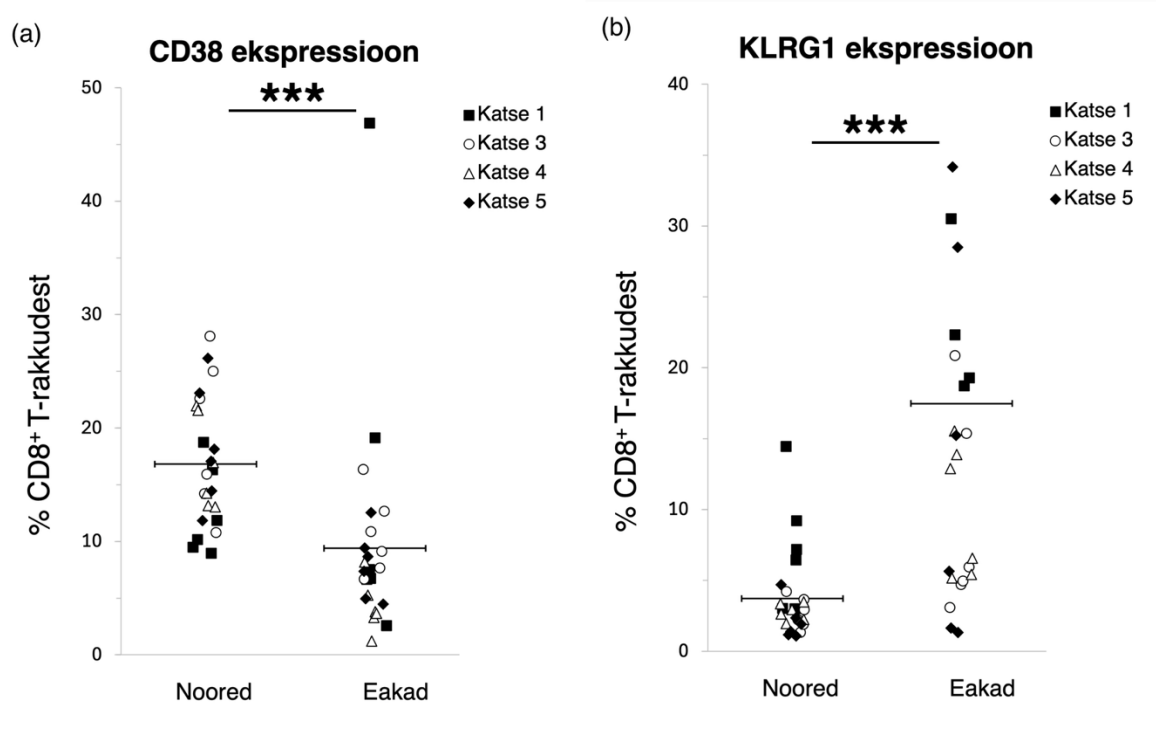
Joonis 4. T-raku alampopulatsioonide osakaal naiivsete CD8⁺ T-rakkude seas noortel ja eakatel. (a) CD27⁺, (b) CD7⁺CD27⁻, (c) CD57⁺CD38⁻, (d) CD38⁺CD7⁺ ja CD38⁺CD57⁻ alampopulatsioonid. Populatsioonide suurus on esitatud protsendina naiivsetest CD8⁺ T-rakkudest. Kastdiagrammid kujutavad mediaani ja kvartiilide vahemikku (IQR). Statistiline olulisus määrati Mann-Whitney U-testiga (GraphPad Prism).

Kõikide diferentseerumismarkerit CD7 ekspresseerivate naiivsete CD8⁺ T-rakkude osakaal ei erinenud noorte ja eakate vahel, kuid detailsem analüüs näitas, et eakatel oli võrreldes noortega suurem CD7⁺CD27⁻ rakkude osakaal (joonis 4b), samas kui CD7⁺CD38⁺ rakkude osakaal oli väiksem (joonis 4d). CD7⁺CD27⁻ naiivsete CD8⁺ T-rakkude osakaalu tõus eakates viitab vahepealsele diferentseerumisastmele, CD27 kadu aga varase naiivse fenotüübi nõrgenemisele. CD7 ekspressiooni säilimine võib aga omakorda viidata nii rohkem diferentseerunud fenotüübile kui ka NK-laadse fenotüübi omandamisele naiivsete CD8⁺ T-rakkude seas. CD7⁺CD38⁺ naiivsete CD8⁺ T-rakkude osakaalu langus aga viitab varajases diferentseerumisastmes funktsionaalsete naiivsete rakkude osakaalu langusele.

Replikatsiooni ja terminaalse diferentseerumise markeri CD57 analüüs näitas, et eakatel esines rohkem CD57⁺CD38⁻ fenotüübiga naiivseid CD8⁺ T-rakke kui noortel (joonis 4c). See viitab korduvalt jagunenud ning hilisemas diferentseerumisastmes T-rakkude akumulatsioonile, mis on kooskõlas homöostaatilise proliferatsiooniga (Kared *et al.*, 2016).

Varajase diferentseerumise markeri CD38 puhul oli eakatel väiksem osakaal CD38 ekspresseerivaid rakke, kui võeti arvesse kõik CD38⁺ rakud sõltumata nende koekspressioonist teiste markeritega (joonis 5a). Täiendava analüüsi käigus uuriti CD38 koekspressiooni teiste

markeritega, et selgitada, millised rakupopulatsioonid täheldatud erinevusi mõjutavad. Koekspressiooni analüüsi põhjal tulenes see erinevus peamiselt $CD38^+CD57^-$ ja $CD38^+CD7^+$ rakkude osakaalu vähenemisest (joonis 4d). $CD38$ ekspressiooni langus eakate naiivsetel $CD8^+$ T-rakkudel viitab vähenenud RTE ehk hiljuti tüümusest väljunud T-rakkude ning on seletatav tüümuse involutsiooniga. Sellest tulenevalt säilib naiivsete T-rakkude populatsioon peamiselt homöostaatilise proliferatsiooni teel. Seda toetab ka $CD38^+CD57^-$ ja $CD38^+CD7^+$ rakkude osakaalu vähenemine, mis viitab just varajases diferentseerumistasmes funktsionaalsete naiivsete rakkude osakaalu langusele.



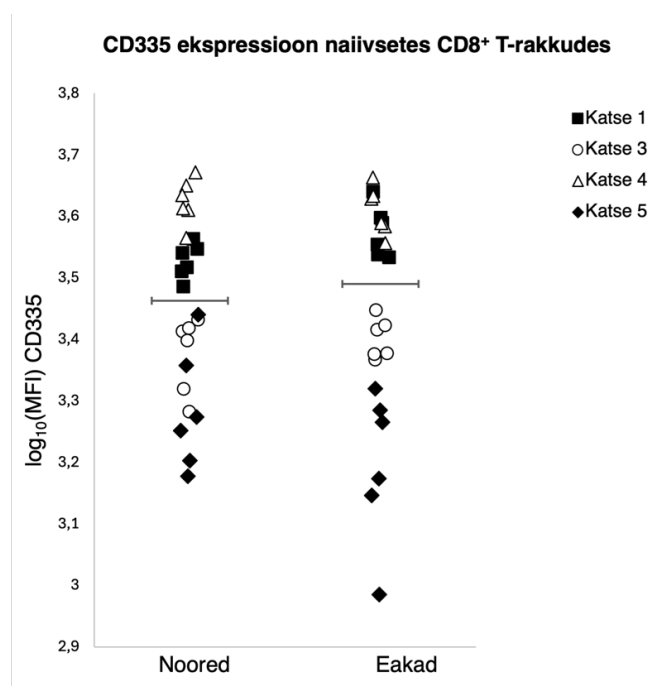
Joonis 5. $CD38$ ja $KLRG1$ ekspresseerivate naiivsete $CD8^+$ T-rakkude osakaal noortes ja eakates doonorites. (a) $CD38$ ekspressioon, (b) $KLRG1$ ekspressioon noorte ja eakate naiivsetes $CD8^+$ T-rakkudes. Iga punkt tähistab üksikut doonorit, sümbolid viitavad erinevatele mõõtmispäevadele. Graafikud on koostatud Excelis. Statistiline olulisus määrati Mann-Whitney U-testiga (GraphPad Prism).

Seega peegeldavad need muutused kooskõlas varasemate uuringutega naiivsete $CD8^+$ T-rakkude populatsioonide ümberkujundamist vananemise käigus, kus väheneb RTE rakkude osakaal ning suureneb perifeerselt säilinud ja jagunemise läbinud rakkude osakaal. See nihe võib omakorda panustada immuunvastuse nõrgenemisse eakatel (Callender *et al.*, 2018; Mittelbrunn ja Kroemer, 2021).

2.3.4 Eakate naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel ilmnevad NK-raku markerid.

Kuna nii varasemad uuringud kui ka meie laboris teostatud transkriptoomi analüüs (avaldamata andmed) näitasid, et eakate naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel ilmnevad NK-rakkudele omased markerid, otsustati järgmisena analüüsida naiivsete CD8⁺ T-rakkudel NK-rakule iseloomulike pinnamarkerite (CD94, CD335, CD56, CD16, KLRG1, NKG2C, DAP12) ekspressiooni.

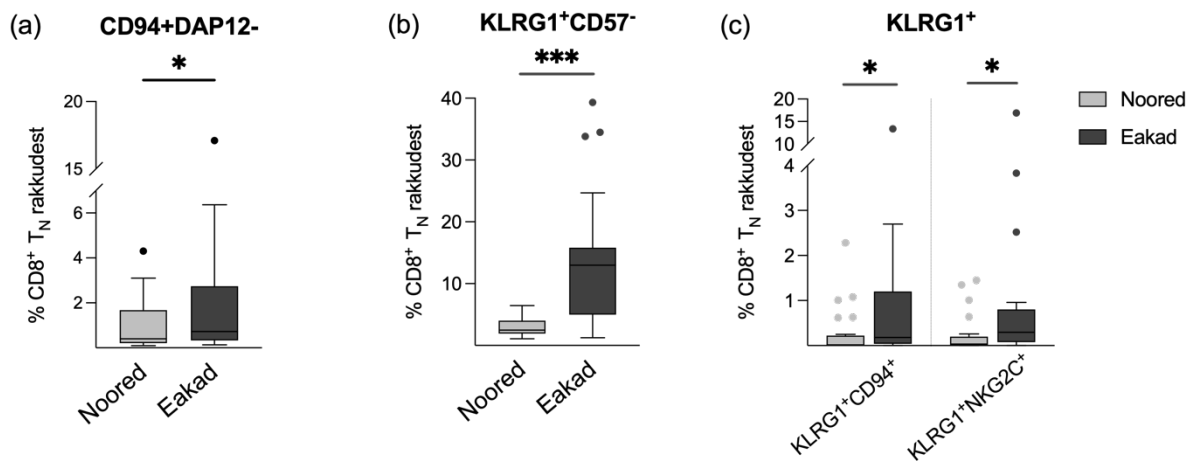
NK-raku markeri CD335 puhul ei olnud võimalik usaldusväärselt määratleda positiivset populatsiooni tavapärase raamistamise strateegia abil, mistõttu hinnati selle markeri ekspressiooni keskmise fluorestsentsi intensiivsuse (MFI) alusel. CD335 ekspressiooni (log₁₀ MFI) võrdlus ei näidanud noorte ja eakate vahel erinevusi (joonis 6). Kahefaktoriline ANOVA analüüs tuvastas mõõtmispäeva efekti ($p < 0,001$), kuid vanuserühmade vahel statistiliselt olulist erinevust ei esinenud ($p = 0,684$). Tulemused olid kooskõlas Mann-Whitney analüüsiga. CD335 ekspressioon varieerus märkimisväärselt indiviidide vahel, kusjuures eakate rühmas täheldati võrreldes noortega suuremat väärtuste hajuvust ja rühmasisest heterogeensust.



Joonis 6. CD335 ekspressioon (log₁₀ MFI) noorte ja eakate naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel. Iga punkt tähistab üksikut doonorit, sümbolid viitavad erinevatele mõõtmispäevadele. Graafik on koostatud Excelis. Statistiline olulisus määrati Mann-Whitney U-testiga (GraphPad Prism).

NK-raku markeri CD94 ekspressiooni analüüsil leiti, et eakatel oli suurem osakaal CD94⁺DAP12⁻ fenotüübiga naiivseid CD8⁺ T-rakke võrreldes noortega (joonis 7a). Sellest lähtuvalt loodi täiendav raam, et hinnata CD94-ga seotud aktiveerivat telge NKG2C-ga (joonis 2c). Kuigi ANOVA analüüs viitas eakatel CD94⁺NKG2C⁺ rakkude osakaalu suurenemisele, ei kinnitanud Mann-Whitney U-test statistiliselt olulist erinevust noorte ja eakate vahel. Seega

võis täheldatud efekt olla mõjutatud rühmasisese variatsioonist ja võimalike äärmuslike väärtuste mõjust keskmistele väärtustele. CD94⁺DAP12⁻ fenotüübiga naiivsete CD8⁺ T-rakkude suurenenu osakaal eakatel võib viidata NK-laadsete tunnuste ilmnemisele naiivsete CD8⁺ T-rakkude hulgas, kuid käesolevas analüüsis ei leitud statistiliselt olulisi muutusi NK-rakkudele iseloomulikus CD94-NKG2C aktiveerivas signaalteljes.



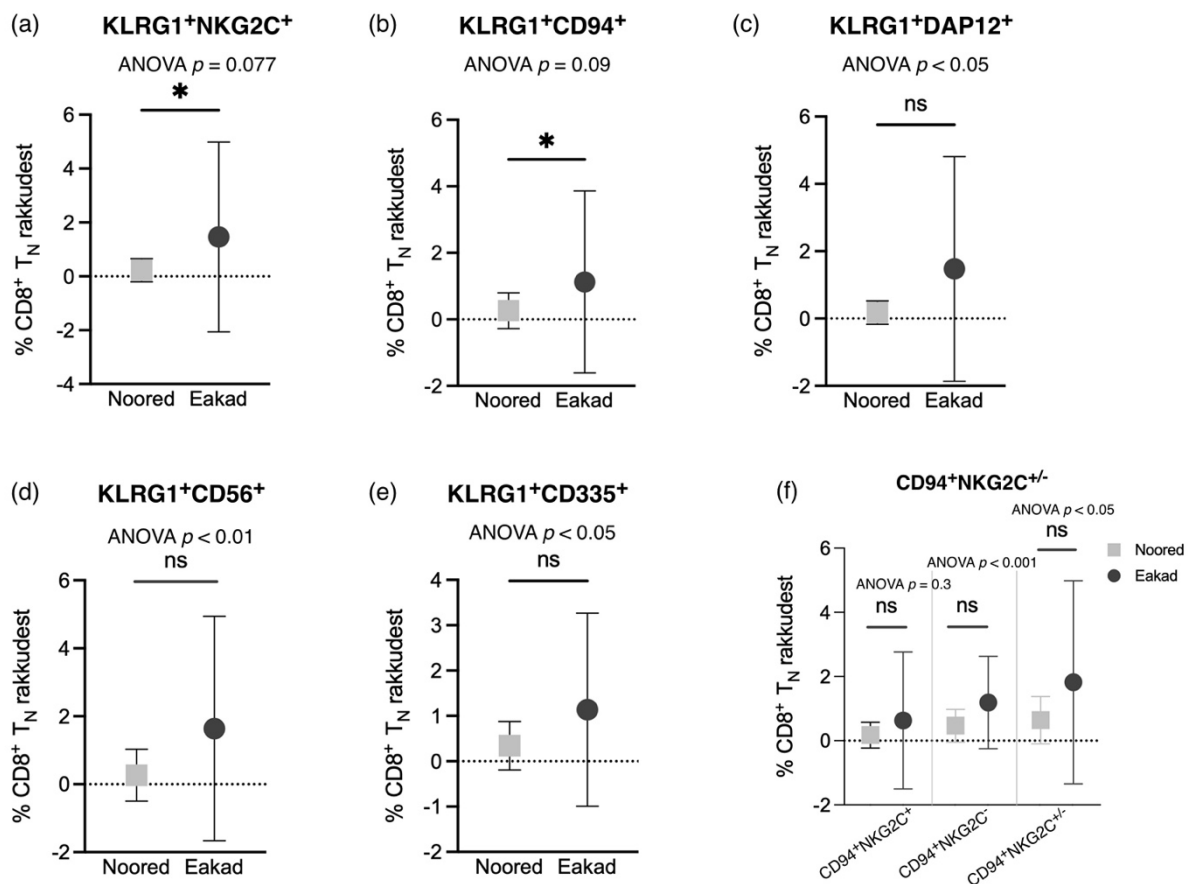
Joonis 7. NK-raku markerite ekspressioon eakate ja noorte naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel. a) CD94⁺DAP12⁻, b) KLRG1⁺CD57⁻, c) KLRG1⁺CD94⁺ ja KLRG1⁺NKG2C⁺ rakkude osakaal naiivsete CD8⁺ T-rakkude hulgas. Kastdiagrammid kujutavad mediaani ja kvartiilidevahemikku (IQR). Statistiline olulisus määrati Mann-Whitney U-testiga (GraphPad Prism).

NK-raku markerite üldekspressiooni analüüs, kus hinnati üksikult markerite ekspressiooni, ei näidanud erinevusi noorte ja eakate vahel. Erandiks oli NK-raku marker ja T-rakkude diferentseerumise ning senesentsi marker KLRG1, mille puhul oli eakatel suurem KLRG1⁺ rakkude osakaal naiivsete CD8⁺ T-rakkude seas (joonis 5b). Koekspressiooni analüüs rakujagunemise ja terminaalse diferentseerumise markeri CD57-ga näitas, et erinevus tulenes peamiselt KLRG1⁺CD57⁻ rakkude osakaalust (joonis 7b), viidates varajasele diferentseerumisele, kus rakud on omandanud diferentseerumisega seotud tunnuseid, kuid ei ole veel jõudnud replikatiivse senesentsi staadiumisse.

Seejärel hinnati, kas noorte ja eakate KLRG1⁺ rakkude seas esineb mitut NK-raku markerit samaaegselt ekspresseerivaid rakke. Selleks loodi täiendavad KLRG1 raamid koos järgnevate NK-raku markeritega CD56, CD94, CD335, DAP12 ja NKG2C (joonis 2d). Lisaanalüüsi tulemusena leiti, et eakatel oli võrreldes noortega suurem osakaal KLRG1⁺ rakke, mis koekspressoerivad CD94 või NKG2C (joonis 7c; vt ka 2.3.6 statistiliste meetodite võrdlust). Antud tulemused viitavad NK-rakule sarnase fenotüübi osalisele omandamisele naiivsete CD8⁺ T-rakkude hulgas vananemise käigus.

2.3.5 Statistiliste meetodite-võrdlus ning töö piirangud

Mitmete markerite puhul viitas kahefaktoriline ANOVA võimalikule katsetevahelisele mõjule, mis võis mõjutada rühmadevaheliste erinevuste hinnangut. Mann-Whitney U-testi põhjal olid nii KLRG1⁺NKG2C⁺ kui ka KLRG1⁺CD94⁺ rakkude osakaalud eakatel statistiliselt kõrgemad, samas kui kahefaktoriline ANOVA nende populatsioonide puhul statistiliselt olulist erinevust ei leidnud (joonis 8a,b). Seevastu KLRG1 koekspressiooni puhul markeritega DAP12, CD56 ja CD335 ei tuvastatud Mann-Whitney U-testiga olulisi erinevusi, kuid kahefaktoriline ANOVA viitas nende populatsioonide erinevusele noorte ja eakate vahel (joonis 8c-e). Sarnast tulemust täheldati ka CD94-NKG2C aktiveeriva telje analüüsil (joonis 8f). KLRG1⁺CD57⁺ rakkude osakaalu erinevus oli aga statistiliselt oluline mõlema meetodi põhjal (joonis 7b).



Joonis 8. Mann-Whitney U-testi ja kahefaktorilise ANOVA tulemuste võrdlus NK-markerite koekspressiooni analüüsil naiivsetes CD8⁺ T-rakkudes. (a) KLRG1⁺NKG2C⁺, (b) KLRG1⁺CD94⁺, (c) KLRG1⁺DAP12⁺, (d) KLRG1⁺CD56⁺, (e) KLRG1⁺CD335⁺, (f) CD94⁺NKG2C^{+/−} rakkude osakaal naiivsete CD8⁺ T-rakkude hulgas. Graafikutel on kujutatud rakupopulatsioonide keskmised osakaalud ja nende varieeruvus. Statistiline olulisus määrati Mann-Whitney U-testiga, lisaks on esitatud kahefaktorilise ANOVA p-väärtused.

ANOVA ja Mann-Whitney testide tulemuste ebakõla viitab andmete suuremale hajuvusele, rühmasisesele varieeruvusele ja valimi väiksusele, mida toetavad ka joonised 5 ja 6, kus eakate

T-rakkude populatsioonides täheldati võrreldes noortega suuremat heterogeensust. Seetõttu tuleks usaldusväärsemate järelduste tegemiseks suurendada doonorite arvu.

Käesoleva uuringu teiseks piiranguks oli uuritud NK-markerite madal ekspressioon naiivsetel CD8⁺ T-rakkudel, sealhulgas eakatel, mistõttu võis marker-positiivsete populatsioonide määramine olla tundlik väikeste raamistamise erinevuste suhtes. Lisaks ei olnud marker-positiivsed ja -negatiivsed populatsioonid alati selgelt eristavad ning populatsioonide raamistamine põhines osaliselt visuaalsel hinnangul. Ühe katse piires kasutati kõikide proovide jaoks ühtseid raame, kuid erinevate katsete vahel võisid raamipiirid vähesel määral erineda. Raamistamisel lähtuti kõige selgemini eristuvatest populatsioonidest ning markerite ekspressioonimustrist kontrollpopulatsioonides. Madala ekspressioonitasemega markerite korral võis positiivsete populatsioonide piiritlemine siiski mõjutada tulemuste võrreldavust.

Kuigi käesolevas töös kasutati FMO (ingl *fluorescence minus one*) kontrolle, rakendati neid ainult valitud markerite puhul. Madala ekspressioonitasemega markerite korral võis see mõjutada positiivsete populatsioonide raamistamise täpsust ning suurendada katsetevahelist varieeruvust.

Täiendava piiranguna tuleb arvestada, et kasutatud fluorokroomiga märgistatud antikehade paneel sisaldas osaliselt kattuvate kiirgusspektritega fluorokroome. Spektraalne-voolutsütomeetria võimaldab samaaegselt kasutada mitut sarnase kiirgusspektriga fluorokroomi ning mõõtmiste käigus viidi läbi vajalikud kompensatsiooni ja fluorestsentssignaalide eristamise etapid. Sellest hoolimata võis fluorokroomide spektraalne kattuvus mõjutada nõrga ekspressiooniga markerite signaalide eristatavust ja tulemuste tõlgendamist, eriti madala intensiivsusega populatsioonide korral.

Edaspidistes katsetes võiks FMO-kontrolle kasutada suurema hulga markerite puhul ja kasutada võimalikult ühtseid raamistamise põhimõtteid, et parandada madala ekspressiooniga markerite eristatavust ning vähendada populatsioonide raamistamisega seotud varieeruvust.

KOKKUVÕTE

Immuunsüsteemi vananemist iseloomustab immuunvastuse üldine nõrgenemine ja madalatasemeline krooniline põletik. Immunosenesentsi tõttu väheneb organismi võime reageerida uutele antigeenidele ning suureneb vastuvõtlikkus infektsioonidele, kasvajatele ja teistele vanusega seotud haigustele. Vananemisega seotud muutused immuunsüsteemis avalduvad eriti adaptiivse immuunsüsteemi T-rakkudes, kus naiivsete T-rakkude populatsioon väheneb ja terminaalset diferentseerunud T-rakkude populatsioon kuhjub. Lisaks on leitud, et terminaalset diferentseerunud $CD8^+$ T-rakud võivad omandada NK-rakkudele iseloomulikke tunnuseid. Samas ei ole teada, kas sarnased fenotüübilised muutused võivad ilmned ka naiivsetes $CD8^+$ T-rakkudes. Sellest lähtudes oli käesoleva töö eesmärk uurida vananemisega kaasnevaid muutusi $CD8^+$ T-rakkudes, keskendudes naiivsete $CD8^+$ T-rakkude fenotüübile ja NK-rakkudele iseloomulike tunnuste omandamisele.

Töös analüüsiti noorte ja eakate doonorite perifeerse vere mononukleaarseid rakke spektraalvoolutsütomeetria abil. Töös leiti, et eakatel on naiivsete $CD8^+$ T-rakkude osakaal vähenenud ning efektormälu T-rakkude osakaal suurenenud. Naiivsete $CD8^+$ T-rakkude markeranalüüs viitas sellele, et eakatel on vähenenud hiljuti tüümusest väljunud naiivsete rakkude osakaal ning suurenenud perifeerselt säilinud ja korduvalt jagunenud rakkude osakaal. Seda toetasid muutused CD27, CD38, CD57 ja CD7 ekspressioonis.

Lisaks leiti, et eakate naiivsetel $CD8^+$ T-rakkudel ilmnevad osaliselt NK-rakkudele iseloomulikud tunnused. Eelkõige suurenes KLRG1⁺ rakkude osakaal ning täheldati KLRG1 koekspressiooni CD94 ja NKG2C markeritega. Need tulemused viitavad sellele, et vananemise käigus võivad ka naiivsed $CD8^+$ T-rakud omandada NK-laadseid fenotüübilisi omadusi.

Uurimistöö tulemused viitavad sellele, et adaptiivse immuunsüsteemi vananemisega võib lisaks T-rakkude alampopulatsioonide hulga muutustele kaasneda ka naiivsete T-rakkude fenotüübiline ümberkujundamine.

SUMMARY

Immune system aging is characterised by a general decline in immune function and the presence of low-grade chronic inflammation. Due to immunosenescence, the body's ability to respond to novel antigens decreases, while susceptibility to infections, cancer, and other age-related diseases increases. Age-related changes in the immune system are particularly evident in adaptive immune system T cells, where a reduction in naive T cells and an accumulation of terminally differentiated T cells have been described. In addition, terminally differentiated CD8⁺ T cells have been shown to acquire NK cell-like characteristics. However, it remains less clear whether similar phenotypic changes may also occur in naive CD8⁺ T cells. Based on this, the aim of the present study was to investigate age-related changes in CD8⁺ T cells, focusing on the phenotype of naive CD8⁺ T cells and the acquisition of NK cell-like properties.

Peripheral blood mononuclear cells from young and elderly donors were analysed using spectral flow cytometry. The study found that elderly individuals had a reduced proportion of naive CD8⁺ T cells and an increased proportion of effector memory T cells. Marker analysis of naive CD8⁺ T cells suggested that elderly individuals had a lower proportion of recent thymic emigrant naive cells and a higher proportion of peripherally maintained and repeatedly divided cells. These findings were supported by changes in the expression of CD27, CD38, CD57, and CD7.

In addition, naive CD8⁺ T cells from elderly individuals were found to partially express NK cell-associated characteristics. In particular, the proportion of KLRG1⁺ cells was increased, and co-expression of KLRG1 with CD94 and NKG2C was observed. These results suggest that naive CD8⁺ T cells may acquire NK-like phenotypic features during aging.

The results of this study indicate that aging of the adaptive immune system involves not only changes in the proportion of T cell subpopulations but also phenotypic remodeling of naive T cells.

TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajaid Maarja Laost, Kai Kisandit, Pärt Petersoni ja kaasjuhendajat Arnold Kristjuhanit, kes olid kogu aasta vältel alati valmis minu küsimustele vastama ja kaasa mõtlema. Hindan nende avatust minu ideedele ja selgitusi olukordades, kui mõni arusaam jäi pisut ennatlikuks.

Eriline tänu Maarjale, kes oli suureks abiks lõputöö kirjutamisel ning aitas kavandada katseid ja töö terviklikku ülesehitust. Kai oli abiks töö eksperimentaalse osa planeerimisel ja tulemuste tõlgendamisel.

Samuti tänan laborikaaslast Tuuliki Pomerantsi ja Maire Pihlapit, kellega koos veetsin pikki päevi laboris katseid tehes. Olen neile tänulik kannatlikkuse ja uute laborimetoodikate õpetamise eest.

Pärt Petersonile olen tänulik võimaluse eest teha uurimistööd molekulaar- ja patoloogia laboris ning toetuse eest teadustööga tutvumisel ja teadusliku mõtteviisi arendamisel.

KASUTATUD ALLIKAD

- Almehmadi, M., Flanagan, B. F., Khan, N., Alomar, S., ja Christmas, S. E. (2014). Increased numbers and functional activity of CD 56⁺ T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects. *Immunology*, 142(2), 258–268. <https://doi.org/10.1111/imm.12250>
- Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., ja Brutkiewicz, R. R. (1995). CD1 Recognition by Mouse NK1⁺ T Lymphocytes. *Science*, 268(5212), 863–865. <https://doi.org/10.1126/science.7538697>
- Bohacova, P., Terekhova, M., Tsurinov, P., ... Artyomov, M. N. (2024). Multidimensional profiling of human T cells reveals high CD38 expression, marking recent thymic emigrants and age-related naive T cell remodeling. *Immunity*, 57(10), 2362-2379.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.08.019>
- Bonorino, P., Leroy, V., Dufeu-Duchesne, T., Tongiani-Dashan, S., Sturm, N., Pernollet, M., Vivier, E., Zarski, J.-P., Marche, P. N., ja Jouvin-Marche, E. (2007). Features and distribution of CD8 T cells with human leukocyte antigen class I–specific receptor expression in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 46(5), 1375–1386. <https://doi.org/10.1002/hep.21850>
- Calder, A. E., Hince, M. N., Dudakov, J. A., Chidgey, A. P., ja Boyd, R. L. (2011). Thymic Involution: Where Endocrinology Meets Immunology. *Neuroimmunomodulation*, 18(5), 281–289. <https://doi.org/10.1159/000329496>
- Callender, L. A., Carroll, E. C., Beal, R. W. J., Chambers, E. S., Nourshargh, S., Akbar, A. N., ja Henson, S. M. (2018). Human CD 8⁺ EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. *Aging Cell*, 17(1), e12675. <https://doi.org/10.1111/acel.12675>
- Chen, S., Zhu, H., ja Jounaidi, Y. (2024). Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. *Signal*

- Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 302. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02005-w>
- Chou, J. P. ja Effros, R. B. (2013). T Cell Replicative Senescence in Human Aging. *Current Pharmaceutical Design*, 19(9), 1680–1698.
<https://doi.org/10.2174/138161213805219711>
- Clémenceau, B., Vivien, R., Debeaupuis, E., Esbelin, J., Biron, C., Levy, Y., ja Vié, H. (2011). FcγRIIIa (CD16) Induction on Human T Lymphocytes and CD16pos T-Lymphocyte Amplification. *Journal of Immunotherapy*, 34(7), 542–549.
<https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31822801d4>
- Desdín-Micó, G., Soto-Herederó, G., Aranda, J. F., ... Mittelbrunn, M. (2020). T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. *Science*, 368(6497), 1371–1376. <https://doi.org/10.1126/science.aax0860>
- Ebbert, M. T. W., Ross, C. A., Pregent, L. J., ... Belzil, V. V. (2017). Conserved DNA methylation combined with differential frontal cortex and cerebellar expression distinguishes C9orf72-associated and sporadic ALS, and implicates SERPINA1 in disease. *Acta Neuropathologica*, 134(5), 715–728. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1760-4>
- Effros, R. B., Dagarag, M., Spaulding, C., ja Man, J. (2005). The role of CD8⁺ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunological Reviews*, 205(1), 147–157.
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00259.x>
- Fedele, G., Trentini, F., Schiavoni, I., ... Stefanelli, P. (2022). Evaluation of humoral and cellular response to four vaccines against COVID-19 in different age groups: A longitudinal study. *Frontiers in Immunology*, 13, 1021396.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1021396>

- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., ja De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1), 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Goronzy, J. J., Fang, F., Cavanagh, M. M., Qi, Q., ja Weyand, C. M. (2015). Naive T Cell Maintenance and Function in Human Aging. *The Journal of Immunology*, 194(9), 4073–4080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500046>
- Grahame-Clarke, C., Chan, N. N., Andrew, D., Ridgway, G. L., Betteridge, D. J., Emery, V., Colhoun, H. M., ja Vallance, P. (2003). Human Cytomegalovirus Seropositivity Is Associated With Impaired Vascular Function. *Circulation*, 108(6), 678–683. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000084505.54603.C7>
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R., ja Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology*, 2(3), 255–260. <https://doi.org/10.1038/85321>
- Hakim, F. T., Flomerfelt, F. A., Boyiadzis, M., ja Gress, R. E. (2004). Aging, immunity and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 16(2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.01.009>
- Hazeldine, J., ja Lord, J. M. (2020). Immunesenescence: A Predisposing Risk Factor for the Development of COVID-19? *Frontiers in Immunology*, 11, 573662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573662>
- Henson, S. M., Franzese, O., Macaulay, R., ... Akbar, A. N. (2009). KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8⁺ T cells. *Blood*, 113(26), 6619–6628. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199588>

- Hyslop, S., Hofferek, C. J., Stegantseva, M. V., Kan, E., McCord, K. A., Alvarez, V. M., Xia, A. Y., Conarty, J. P., Wieland, A., ja Hudson, W. H. (2025). CD7 regulates the persistence of terminally exhausted CD8⁺ T cells during chronic infection. *Cell Reports*, 44(10), 116316. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.116316>
- Jin, J.-H., Huang, H.-H., Zhou, M.-J., ... Wang, F.-S. (2020). Virtual memory CD8⁺ T cells restrain the viral reservoir in HIV-1-infected patients with antiretroviral therapy through derepressing KIR-mediated inhibition. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(12), 1257–1265. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0408-9>
- Kakuda, T., Suzuki, J., Matsuoka, Y., Kikugawa, T., Saika, T., ja Yamashita, M. (2023). Senescent CD8⁺ T cells acquire NK cell-like innate functions to promote antitumor immunity. *Cancer Science*, 114(7), 2810–2820. <https://doi.org/10.1111/cas.15824>
- Kared, H., Martelli, S., Ng, T. P., Pender, S. L. F., ja Larbi, A. (2016). CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(4), 441–452. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1803-z>
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J. A., Sinclair, A. J., Nayak, L., ja Moss, P. A. H. (2002). Cytomegalovirus Seropositivity Drives the CD8 T Cell Repertoire Toward Greater Clonality in Healthy Elderly Individuals. *The Journal of Immunology*, 169(4), 1984–1992. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.4.1984>
- Koh, J.-Y., Kim, D.-U., Moon, B.-H., ja Shin, E.-C. (2023). Human CD8⁺ T-Cell Populations That Express Natural Killer Receptors. *Immune Network*, 23(1), e8. <https://doi.org/10.4110/in.2023.23.e8>
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., ja Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055), 675–678. <https://doi.org/10.1038/319675a0>

- Lee, S.-W., Lee, G.-W., Kim, H.-O., ja Cho, J.-H. (2023). Shaping Heterogeneity of Naive CD8⁺ T Cell Pools. *Immune Network*, 23(1), e2. <https://doi.org/10.4110/in.2023.23.e2>
- Li, J., Zaslavsky, M., Su, Y., ... Davis, M. M. (2022). KIR⁺ CD8⁺ T cells suppress pathogenic T cells and are active in autoimmune diseases and COVID-19. *Science*, 376(6590), eabi9591. <https://doi.org/10.1126/science.abi9591>
- Lian, J., Yue, Y., Yu, W., ja Zhang, Y. (2020). Immunosenescence: A key player in cancer development. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00986-z>
- Liu, Z., Liang, Q., Ren, Y., Guo, C., Ge, X., Wang, L., Cheng, Q., Luo, P., Zhang, Y., ja Han, X. (2023). Immunosenescence: Molecular mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01451-2>
- Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A., Van Den Brink, M. R. M., Boyd, R., ja Sempowski, G. D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends in Immunology*, 30(7), 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.003>
- Mace, E. M. (2023). Human natural killer cells: Form, function, and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 151(2), 371–385. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.09.022>
- Michel, J. J., Griffin, P., ja Vallejo, A. N. (2016). Functionally Diverse NK-Like T Cells Are Effectors and Predictors of Successful Aging. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00530>
- Mittelbrunn, M., ja Kroemer, G. (2021). Hallmarks of T cell aging. *Nature Immunology*, 22(6), 687–698. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00927-z>

- Mogilenko, D. A., Shchukina, I., ja Artyomov, M. N. (2022). Immune ageing at single-cell resolution. *Nature Reviews Immunology*, 22(8), 484–498.
<https://doi.org/10.1038/s41577-021-00646-4>
- Moretta, A., ja Moretta, L. (1997). HLA class I specific inhibitory receptors. *Current Opinion in Immunology*, 9(5), 694–701. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(97\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80051-9)
- Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R. R., Lord, J. M., ja Shaw, A. C. (2009). Human innate immunosenescence: Causes and consequences for immunity in old age. *Trends in Immunology*, 30(7), 325–333.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2009.05.004>
- Pawelec, G. (2002). T cells and aging january 2002 update. *Frontiers in Bioscience*, 7(4), d1056-1183. <https://doi.org/10.2741/A831>
- Pereira, B. I., De Maeyer, R. P. H., Covre, L. P., ... Akbar, A. N. (2020). Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8⁺ T cells. *Nature Immunology*, 21(6), 684–694. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3>
- Prelog, M. (2006). Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity? *Autoimmunity Reviews*, 5(2), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.09.008>
- Puzianowska-Kuźnicka, M., Owczarz, M., Wieczorowska-Tobis, K., Nadrowski, P., Chudek, J., Slusarczyk, P., Skalska, A., Jonas, M., Franek, E., ja Mossakowska, M. (2016). Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: The PolSenior study. *Immunity & Ageing*, 13(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12979-016-0076-x>
- Rasa, S. M. M., Annunziata, F., Krepelova, A., ... Neri, F. (2022). Inflammaging is driven by upregulation of innate immune receptors and systemic interferon signaling and is ameliorated by dietary restriction. *Cell Reports*, 39(13), 111017.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111017>

- Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M., ja Rodella, L. F. (2014). Thymus and aging: Morphological, radiological, and functional overview. *AGE*, 36(1), 313–351.
<https://doi.org/10.1007/s11357-013-9564-5>
- Rodriguez, I. J., Lalinde Ruiz, N., Llano León, M., Martínez Enríquez, L., Montilla Velásquez, M. D. P., Ortiz Aguirre, J. P., Rodríguez Bohórquez, O. M., Velandia Vargas, E. A., Hernández, E. D., ja Parra López, C. A. (2021). Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review. *Frontiers in Immunology*, 11, 604591.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604591>
- Sidler, C., Wóycicki, R., Ilnytsky, Y., Metz, G., Kovalchuk, I., ja Kovalchuk, O. (2013). Immunosenescence is associated with altered gene expression and epigenetic regulation in primary and secondary immune organs. *Frontiers in Genetics*, 4.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00211>
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., ja Moretta, A. (1997). P46, a Novel Natural Killer Cell–specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(7), 1129–1136.
<https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1129>
- Spaulding, C., Guo, W., ja Effros, R. B. (1999). Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Experimental Gerontology*, 34(5), 633–644.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(99\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00033-9)
- Surh, C. D., ja Sprent, J. (2000). Homeostatic T Cell Proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(4), F9–F14. <https://doi.org/10.1084/jem.192.4.F9>
- Zhang, Y., Chen, S., Tang, X., Peng, Y., Jiang, T., Zhang, X., Li, J., Liu, Y., ja Yang, Z. (2024). The role of KLRG1: A novel biomarker and new therapeutic target. *Cell*

- Communication and Signaling*, 22(1), 337. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01714-7>
- Taniguchi, M., Seino, K., ja Nakayama, T. (2003). The NKT cell system: Bridging innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 4(12), 1164–1165.
<https://doi.org/10.1038/ni1203-1164>
- Tong, Q.-Y., Zhang, J.-C., Guo, J.-L., Li, Y., Yao, L.-Y., Wang, X., Yang, Y.-G., ja Sun, L.-G. (2020). Human Thymic Involution and Aging in Humanized Mice. *Frontiers in Immunology*, 11, 1399. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01399>
- Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P., ja Reimand, K. (2024). *Immunoloogia: Õpik kõrgkoolidele*. Tartu Ülikooli Kirjastus. <https://hdl.handle.net/10062/106109>
- Vallejo, A. N., Mueller, R. G., Hamel, D. L., Way, A., Dvergsten, J. A., Griffin, P., ja Newman, A. B. (2011). Expansions of NK-like $\alpha\beta$ T cells with chronologic aging: Novel lymphocyte effectors that compensate for functional deficits of conventional NK cells and T cells. *Ageing Research Reviews*, 10(3), 354–361.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.09.006>
- Van Aalderen, M. C., Van Lier, R. A. W., ja Hombrink, P. (2021). How to Reliably Define Human CD8⁺ T-Cell Subsets: Markers Playing Tricks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(11), a037747.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037747>
- Wang, C., Liu, X., Li, Z., ... Zhang, M. (2015). CD8⁺NKT-like cells regulate the immune response by killing antigen-bearing DCs. *Scientific Reports*, 5(1), 14124.
<https://doi.org/10.1038/srep14124>
- Wang, Q., Chen, S., Guo, Z., Xia, S., ja Zhang, M. (2024). NK-like CD8 T cell: One potential evolutionary continuum between adaptive memory and innate immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 217(2), 136–150. <https://doi.org/10.1093/cei/uxae038>

Kasutatud AI

OpenAI. (2025). ChatGPT (GPT-5.5 versioon), suur keelemudel, <https://chat.openai.com/>

Lihtlitsents

Mina, Hanna Merilyn Kreegipuu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Vananev adaptiivne immuunsüsteem ja NK-laadsed CD8+ T-rakud,

mille juhendajad on Maarja Laos, Pärt Peterson, Kai Kisand ja Arnold Kristjuhan,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Hanna Merilyn Kreegipuu

20.05.2026