

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

MOLEKULAARPATOLOGIA UURIMISGRUPP

**T-RAKU PANEELI OPTIMEERIMINE SPEKTRAALSE VOOLUTSÜTOMEETRI**

**JAOKS**

Magistritöö

30 EAP

Tuuliki Pomerants

Juhendaja

PhD Jaanika Kärner

TARTU 2024

# Infoleht

## T-RAKU PANEELI OPTIMEERIMINE SPEKTRAALSE VOOLUTSÜTOMEETRI JAOKS

See töö keskendub spektraalvootsütomeetria paneeli optimeerimisele T-rakkude immuunfenotüpiseerimiseks. Spektraalvootsütomeetrias mõõdetakse iga kasutatava fluorokroomi kogu emissioonispektrit. Paneel on välja töötatud perifeerse vere mononukleaarsete rakkude (PBMC) jaoks ning optimeerimisprotsessi käigus kasutati 8 erineva indiviidi rakke. Töö esimeses etapis kasutati 68 antikeha ning leiti, kas need seonduvad paremini fikseeritud või fikseerimata rakkudele. Teises etapis tiitriti 50 antikeha, et leida optimaalne kontsentratsioon signaali kõige paremaks eristamiseks. Seejärel katsetati erinevaid T-rakkude paneeli versioone, kuni leiti parim. Töö käigus optimeeriti kaks paneeli. Üks on suunatud raku pinnal olevatele markeritele, koosnedes 23 antikehast ja teine, mis on suunatud raku sisestele markeritele, koosnedes 8 antikehast. Paneelid kokku lubavad eristada 35 erinevat T-rakkude populatsiooni. Tulevikus on paneele võimalik veelgi täiustada, parandades täpsust ja lisades uusi antikehi, suurendades tuvastavate rakupopulatsioonide arvu.

**Märksõnad:** T-lümfotsüüdid, Immuunfenotüpiseerimine, Spektraalnevoolutsütomeetria

**CERCS:** B500 immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

## OPTIMIZING A T-CELL PANEL FOR SPECTRAL FLOW CYTOMETER

This work focuses on optimizing a spectral flow cytometry panel for T-cell immunophenotyping. In spectral flow cytometry, the entire emission spectrum of each used fluorochrome is measured. The panel is developed for peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and samples from 8 different individuals were used. The first stage involved testing 68 antibodies to determine whether they bind better to fixed or unfixed cells. In the second stage, 50 antibodies were titrated to find the optimal concentration for the best distinguishable signal. Different versions of the T-cell panel were then tested until the best one was identified. The end result is the optimization of two panels. One which focuses on cell-surface markers, consisting of 23 different antibodies. The other is for the detection of internal markers, consisting of 8 antibodies. In total the panels allow for the differentiation of 35 distinct T-cell populations. In the future, the panels could be further enhanced to improving the accuracy and to increase detectable populations.

**Keywords:** T-lymphocytes, Immunophenotyping, Spectral Flow cytometry

**CERCS:** B500 Immunology, serology, transplantation

## SISUKORD

Infoleht .....	2
Kasutatud lühendid .....	5
Sissejuhatus .....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1. Immuunfenotüüpiseerimine .....	8
1.2. T-rakud .....	9
1.2.1. Retseptorid ja aktivatsioon .....	9
1.2.2. T-rakkude alapopulatsioonid .....	12
1.2.2.1. Tsütotoksilised T-rakud .....	12
1.2.2.2. Abistaja T-rakud .....	13
1.2.2.3. MAIT .....	16
1.2.2.4. Mälu T-rakud .....	16
1.2.3. T-rakkude uurimise vajalikkus .....	17
1.3. Voolutsütomeetria .....	18
1.3.1. Spektraalse voolutsütomeetri ehitus ja tööpõhimõte ning erinevus konventsionaalsest voolutsütomeetrist .....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	22
2.1. Töö eesmärgid .....	22
2.2. Materjal ja meetodika .....	22
2.2.1. Valimi kirjeldus .....	22
2.2.2. Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine ja külmutamine .....	22
2.2.3. PBMCde sulatamine .....	23
2.2.4. PBMCde fikseerimine, permeabiliseerimine ja värving .....	23
2.2.5. T-rakkude aktiveerimine aktivatsiooni-inhibitsiooni-ning proliferatsioonimarkerite värvimiseks .....	26
2.2.6. Antikehade optimaalse tiitri leidmine .....	27
2.2.7. T-rakkude paneeli loomine spektraal voolutsütomeetrile .....	27
2.2.8. Spektraalse referentsiraamatukogu loomine .....	30
2.2.9. Spektraalse voolutsütomeetriga mõõtmised .....	30
2.2.10. Töös kasutatud tarkvarad .....	31
3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	32
3.1.1. Fikseeritud ja permeabiliseeritud <i>versus</i> fikseerimata antikehad .....	32
3.1.2. Antikehadele optimaalse tiitri leidmine .....	35

3.1.3. Paneeli disain ja tulemused.....	41
KOKKUVÕTE .....	48
SUMMARY .....	49
Tänuõnad.....	50
ALLIKAD .....	51
Kirjanduse loetelu .....	51
Kasutatud veebiallikad.....	62
LISAD .....	63
Lihtlitsents .....	69

## Kasutatud lühendid

ADC	Analoog-digitaalmuundur (Ingl. <i>Analog to digital converter</i> )
APC	Antigeeni esitav rakk (Ingl. <i>antigen presenting cell</i> )
Bcl-6	Ingl. <i>B-cell lymphoma 6</i>
CCR	C-C-motiiviga kemokiini retseptor (Ingl. <i>C-C motif chemokine receptor</i> )
CD	Differentseerumise klaster (Ingl. <i>cluster of differentiation</i> )
CM	Tsentraalne mälorakk (Ingl. <i>Central memory cell</i> )
CTL	Tsütotoksiline T-rakk (Ingl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> )
CTLA-4	Ingl. <i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
CXCR	C-X-C motiiviga kemokiini retseptor (Ingl. <i>C-X-C motif chemokine receptor</i> )
DC	Dendriittrakud (Ingl. <i>dendritic cells</i> )
DMSO	Dimetüül sulfoksiid (Ingl. <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
EM	Efektor mälorakk (Ingl. <i>effector memory cell</i> )
EOMES	Eomesodermiin (Ingl. <i>eomesodermin</i> )
FBS	Veise loote seerum (Ingl. <i>Fetal bovine serum</i> )
FoxP3	Ingl. <i>Forkhead Box P3</i>
FSC	Valguse otsehajumine (Ingl. <i>forward scatter</i> )
GATA3	Ingl. <i>GATA binding protein 3</i>
HEV	Postikapillaarne veenul (Ingl. <i>high endothelial venule</i> )
HIV	Inimese immuunpuudulikkuse viirus (Ingl. <i>Human immunodeficiency virus</i> )
HLA	HLA antigeen (Ingl. <i>human leukocyte antigen</i> )
ICOS	Ingl. <i>Inductable T-cell costimulator</i>
IFN- $\gamma$	Interferoon-gamma (Ingl. <i>interferon-gamma</i> )
IL	Interleukiin (Ingl. <i>interleukin</i> )
IL-R	Interleukiini retseptor (Ingl. <i>interleukin receptor</i> )
LFA3	Ingl. <i>lymphocyte associated antigen 3</i>
MAIT	Ingl. <i>Mucosal-associated invariant T-cells</i>
MFI	Fluoretsentsi intensiivuse keskmine (Ingl. <i>mean fluorescence index</i> )
MR1	Ingl. <i>MHC I related molecule</i>
NK	Loomulikud tapjarakud (Ingl. <i>natural killer cells</i> )

PBMC	Perifeerse vere mononukleaarsed rakud (Ingl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Fosfaadiga puhverdatud soolalahus (Ingl. <i>Phosphate buffered saline</i> )
PD1	Ingl. <i>programmed cell death protein 1</i>
PID	Primaarsed immuunpuudulikkused (Ingl. <i>primary immunodeficiencies</i> )
RB	Jooksutamispuhver (Ingl. <i>running buffer</i> )
ROR- $\gamma$	Ingl. <i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RPMI	Ingl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SI	Värvimisindeks (Ingl. <i>staining index</i> )
SSC	Valguse kõrvalhajumine (Ingl. <i>side scatter</i> )
STAT	Ingl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
T-bet	Ingl. <i>T-box transcription factor</i>
TCR	T-raku retseptor (Ingl. <i>T-cell receptor</i> )
TEMRA	Terminaalselt diferentseerunud efektor mälu T-rakud (Ingl. <i>terminally differentiated effector memory T-cells</i> )
Tfh	Folikulaar T-abistaja rakk (Ingl. <i>follicular T-helper cell</i> )
TGF- $\beta$	Transformeeruv kasvufaktor beeta (Ingl. <i>transforming growth factor beta</i> )
Th	Abistaja T-rakk (Ingl. <i>T-helper cells</i> )
TNF	Kasvaja nekroosi faktor (Ingl. <i>tumor necrosis factor</i> )
Treg	Regulatoorne T-rakk (Ingl. <i>regulatory T-cell</i> )

## Sissejuhatus

Immuunsüsteem on tervet keha hõlmav süsteem, mille saab jagada kaheks – kaasasündinud ja omandatud immuunsuseks. T-lümfotsüüdid ehk T-rakud on oluline osa omandatud immuunsusest. Nad on võimelised ise hävitama nakatunud rakke ja samuti suudavad nad aktiveerida teisi immuunsüsteemi rakke. T-rakud jagunevad omakorda mitmeks alapopulatsiooniks, mis kõik panustavad organismi kaitsesse neile iseloomulike mehhanismide kaudu. T-rakkude uurimiseks on neid kõigepealt vaja eristada nii üksteisest kui ka teistest immuunsüsteemi rakkudest. Seda eristamist nimetatakse immuunfenotüpiseerimiseks

Üks viis, kuidas rakke immuunfenotüpiseeritakse on voolutsütomeetria. Valdkonnas on toimunud suur edasiareng tänu spektraalse voolutsütomeetri leiutamisele. Spektraalne voolutsütomeeter kasutab omapärast optilise süsteemi lahendust, mis lubab mõõta korraga tervet rakkude märgistamiseks kasutatavate markerite (fluoretsentsvärviga konjugeeritud antikeha) kiirgumisspektrit. See võimaldab paremini värve üksteisest eristada, mis tähendab, et spektraalsele voolutsütomeetrile saab luua paneele, mis sisaldavad palju rohkem markereid, kui võimalik konventsionaalsele voolutsütomeetrile. Suurem paneel tähendab, et on võimalik tuvastada rohkem rakutüpe ühe proovi kohta.

Immuunfenotüpiseerimise abil on võimalik kirjeldada erinevaid immuunsüsteemi rakkude populatsioone. Teadmised, kuidas rakkude populatsioonid jagunevad ning muutused nende normist on kasulikud erinevate haiguste diagnoosimiseks ja jälgimiseks. Luues paneeli, mis lubab uurida mitmeid alatüpe korraga, saab suurendada ühest proovist saadavat infot, olles samal ajal uuritava jaoks minimaalselt invasiivne.

Käesoleva töö eesmärgiks oli optimiseerida spektraalse voolutsütomeetria jaoks antikehadest koosnev paneel, mis võimaldaks immuunfenotüpiseerida T-rakke perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest.

Magistritöö valmis Meditsiiniteaduste valdkonnas, Bio- ja Siirdemeditsiini instituudis, Molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

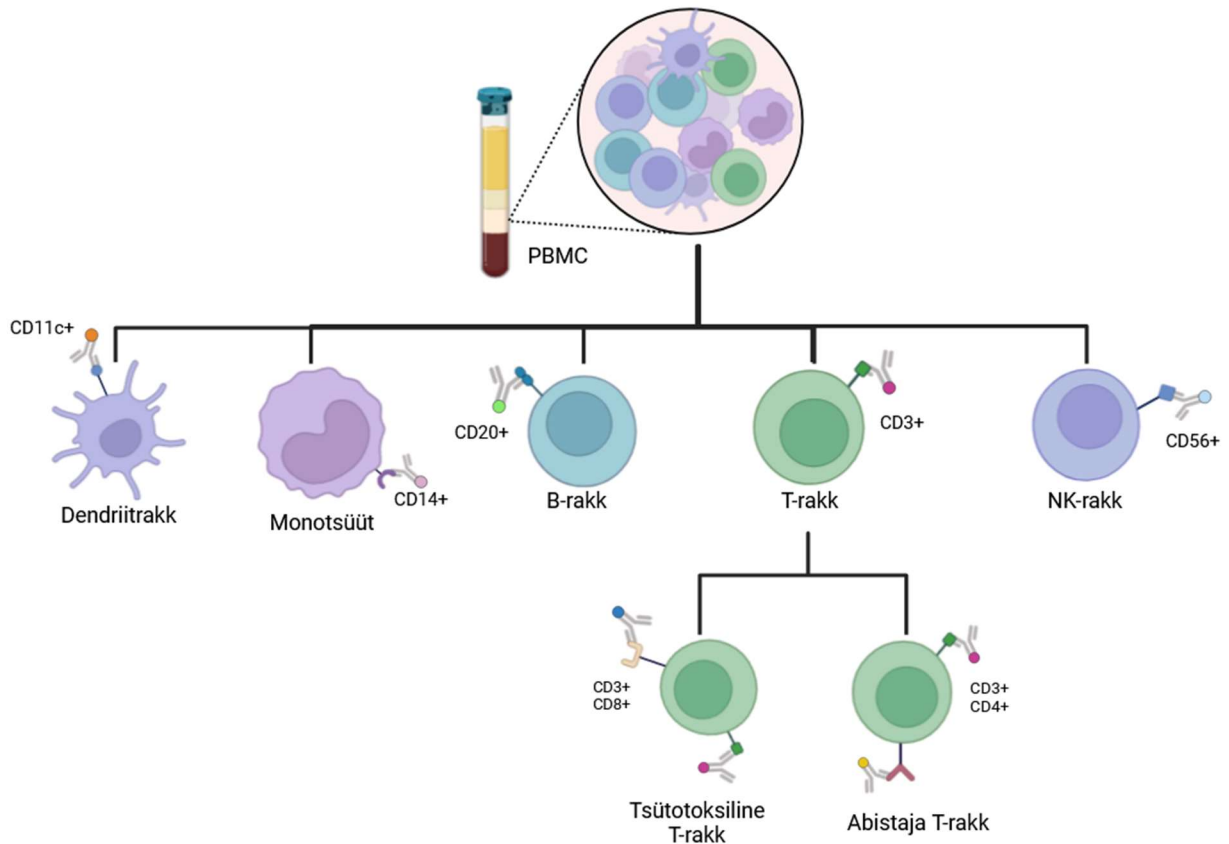
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Immuunfenotüpiseerimine

Rakkude populatsioonide uurimiseks tuleb kasutada lahendust, mis võimaldaks rakke üksteisest eristada, leida nende alapopulatsioone ja kirjeldada nende arengustaadiumit. Tehnika, mida selleks kasutatakse on immuunfenotüpiseerimine, kus vaadatakse rakkude poolt ekspresseeritavaid molekule ja retseptoreid (Herold & Mitra, 2024). Immunoloogias on kasutusel differentseerumise klastril baasil loodud nomenklatuuri süsteem (cluster of differentiation, CD), mis põhineb monoklonaalsetel antikehadel, kus antigeeniks on valitud üks konkreetne raku pinnamolekul. Spetsiifilise sidumise korral saab molekul omale unikaalse CD numbril. Sidumise detekteerimiseks on antikehale juurde lisatud fluorokroom, mille signaali saab tuvastada näiteks kasutades voolutsütomeetria (Engel et al., 2015). Süsteemi kasutuselevõtt on olnud teatud raskustega, kuna molekulidel kasutatakse jätkuvalt samaaegselt alternatiivseid nimetusi, mis oli neile antud enne süsteemi loomist, märkimata nende CD numbrit.

Kui analüüsida erinevaid rakutüpe sisaldavaid proove on oluline kindlaks neid populatsioone eristada. Seda saab teha, tuvastades markeritele lisatud fluorokroomi signaali olemasolu ja selle intensiivsust. Ainult ühe retseptori hindamine on väheinformatiivne, kuna seda võivad ekspresseerida mitu erinevat rakutüpi. Informatiivne on ka see, kui fluorokroomilt signaal puudub (Maecker et al., 2012). Joonisel 1 on näidatud, kuidas eristatakse PBMC-des (perifeerse vere mononukleaarsed rakud, *peripheral blood mononuclear cells*) hulgas leiduvaid rakutüpe.

Immuunfenotüpiseerimisele on võimalik peale pinnamarkerite lisada ka rakusiseseid markereid, nagu näiteks transkriptsioonifaktorid. Nende lisamine aitab kaasa rakkude kirjeldamisele, võimaldades teada saada näiteks, kas immuunrakud on hiljuti olnud aktiveeritud või mitte. Nende markerite kasutamiseks on vaja proovid eelnevalt permeabiliseerida, et antikehad pääseksid läbi rakumembraani (McKinnon, 2018).



**Joonis 1. Immuunfenotüpiseerimise põhimõte.** Kasutades PBMC-sid. Joonisel on kujutatud viie erineva rakutüübi eristamist nende poolt ekspresseeritavate markerite alusel. T-rakkudel on näidatud, kuidas toimub nende alapopulatsioonideks määramine kahe markeri ekspressiooni abil. Joonis on loodud autori poolt kasutades BioRender programmi.

## 1.2. T-rakud

### 1.2.1. Retseptorid ja aktivatsioon

T-lümfotsüüdid ehk T-rakud on fundamentaalsed komponendid omandatud immuunsuse efektiivseks toimimiseks. Iga T-rakk ekspresseerib oma pinnal unikaalset heterodimeerset T-raku retseptorit (*T-cell receptor*, TCR):  $\alpha$  ja  $\beta$  isomeerid on enamlevinud, kuid väikesel osal T-rakkudest koosneb TCR  $\gamma$  ja  $\delta$  isomeeridest (Shah *et al.*, 2021). TCR ei ole eraldiseisev retseptor, vaid on osa kompleksist raku pinnal, mis hõlmab ka teisi ko-retseptoreid, nagu näiteks CD3. See valkude kompleks on vajalik TCR ekspressiooniks ja signaaliülekanne vahendamiseks. (Bonilla ja Oettgen, 2010; Mayer *et al.*, 2018).

T-rakud pärinevad luuüdist ja liiguvad edasi tuumusesse, kus nad küpsevad ja läbivad selektsiooniprotsessi (Kumar *et al.*, 2018). Tuumusest väljuvad naiivsed T-rakud, mis kannavad oma pinnal CD45RA isovormi ning CCR7 (C-C-motiiviga kemokiini retseptor, *C-C motif chemokine receptor*, CD197), mille ligandid on leitavad lümfisõlmedes. Kemokiinide gradienti pidi hakkab naiivne T-rakk liikuma vereringest lümfisõlmes asuvasse postkapillaarsesse veenulisse (*high endothelial venule*, HEV) (Charles A Janeway *et al.*, 2001).

Seal saab toimuda „kolme signaali teooria“ alusel T-rakkude aktivatsioon (Joonis 2). Aktivatsiooniks on vaja, et TCR tunneks ära oma antigeeni, milleks on keharakkudest või patogeenset päritolu peptiidjärjestus, mida esitletakse HLA antigeeni (*Human Leukocyte antigen*, HLA) abil. HLA I on leitav kõigi keharakkudel ja HLA II on antigeeni esitavate rakkude (*antigen presenting cell*, APC) pinnal. TCR ja HLA vahel tekib immunoloogiline sünaps, mis koosneb neile lisaks mitmetest retseptoritest ja nende ligandidest. Üheks selliseks on ko-retseptor CD4 või CD8 (Bonilla ja Oettgen, 2010). HLA ja TCR interaktsioon käivitab signaalide kaskaadi, mille lõpptulemusena algab aktivatsioonigeenide ekspressioon.

Lisaks asuvad immunoloogilises sünapsis ko-stimulaatorsed ning tsütokiinidele reageerivad retseptorid, kus T-rakk saab vastavalt teise ja kolmanda signaali. Juhul kui rakk ei saa ko-stimulaatoriselt retseptorilt signaali võib see muutuda anergilliseks ning kaotada võime aktiveeruda (Appleman ja Boussiotis, 2003). Ko-stimulaatorsed retseptorid on ekspresseeritud T-rakkudel ja nende ligandid pärinevad APC-st, mille ülesregulatsioon sõltub nende aktiveerituse astmest (Corthay, 2006).

T-rakkude üheks olulisemaks ko-stimulaatorseks signaaliks on see, mis tekib retseptori CD28 ning ligandi B7 (CD80/CD86) interaktsioonist, mille tõttu hakkavad rakus toimuma protsessid, mis kutsuvad esile IL-2 (interleukiin-2, *interleukin-2*) sünteesi (Acuto ja Michel, 2003). Samuti saab mainida CD28-geeni oma ligandiga LFA3 (*Lymphocyte associated antigen-3*, CD58), mis stabiliseerib TCR ja HLA kompleksi (Binder *et al.*, 2020). Ko-stimulaatorsete retseptorite hulka kuulub ka CD27, mille ligandiks on CD70, mis aitab rakupinnal rohkem IL-2R (interleukiin-2 retseptor, *interleukin-2 receptor*,) ekspresseerida (Grant *et al.*, 2017).

Kolmas T-raku aktivatsiooniks ja ka diferentseerumiseks vajalik signaal pärineb tsütokiinidelt, mis on toodetud nii T-raku enda kui ka APC poolt (Curtsinger *et al.*, 2003). Üheks olulisemaks tsütokiiniks on IL-2, mis on vajalik nende ellujäämiseks ja jagunemiseks. IL-2 tootmine erineb rakkude vahel, CD4<sup>+</sup> T-rakud suudavad toota seda piisavalt suurtes kogustes, et katta autokriinselt

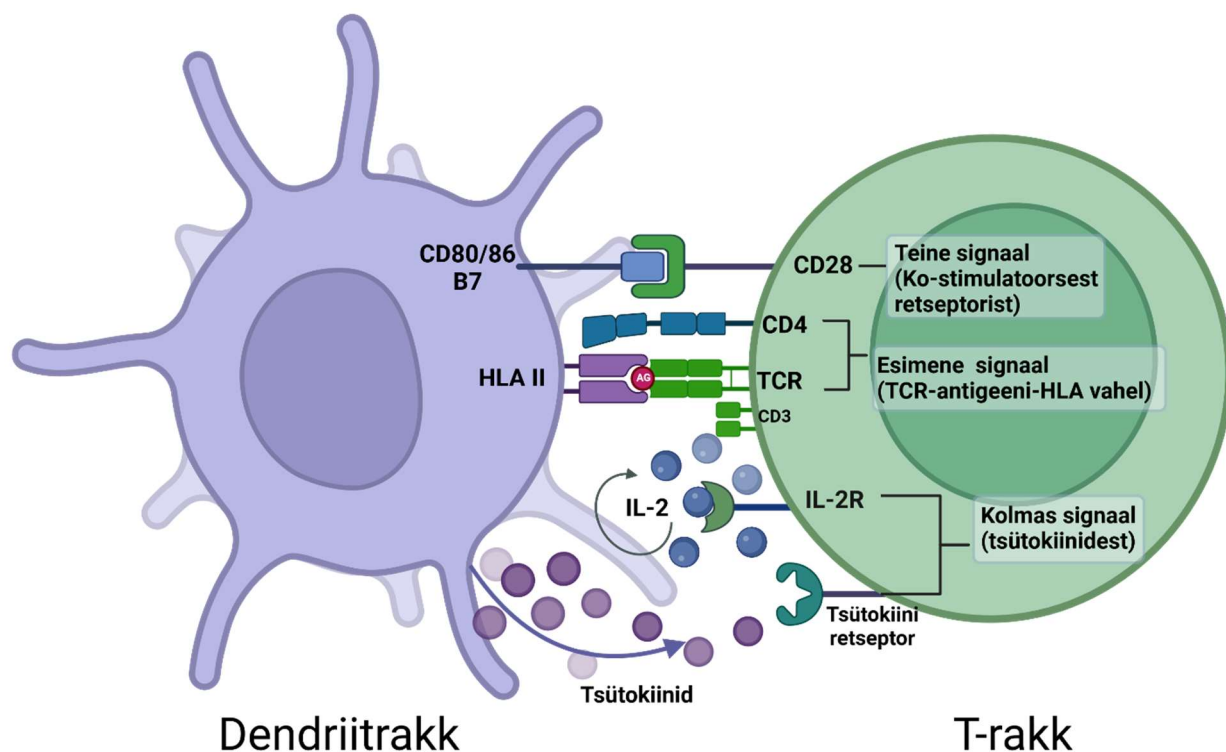
oma vajadused. CD8+ rakkude, IL-2 produktsioon on madalam ja nad vajavad CD4+ rakkude toodetud IL-2 (Boyman ja Sprent, 2012). T-rakud puutuvad kokku ka APCde poolt toodetud tsütokiinidega, mis sõltuvad kokkupuutunud antigeeni allikaga ning määravad ära, millise alapopulatsiooni suunas areng jätkub (Tai *et al.*, 2018).

Peale nende signaalide saamist algab värskest aktiveeritud T-rakkude kлонаalne ekspansioon, mis hõlmab endast esitatud antigeenile reageeriva TCR-i omavate T-rakkude kiiret proliferatsiooni (Curtsinger *et al.*, 2003). Seda on võimalik tuvastada kasutades rakusisest markerit Ki-67 (Soares *et al.*, 2010).

Aktivatsiooni signaalide tulemusena hakkab T-rakk oma pinnal ekspresseerima varajast aktivatsioonimarkerit - CD69, mis aitab hoida veel jagunevaid rakke lümfisõlmedes (Cibrián ja Sánchez-Madrid, 2017), hiljem see reguleeritakse alla. 24h möödumisel hakkavad T-rakud oma pinnal ekspresseerima hilist aktivatsioonimarkerit HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen - DR isotype*) (Saraiva *et al.*, 2021). Päev pärast aktivatsiooni jõuab CD38 ekspressioon oma tipp-punkti, selle retseptori interaktsioon aitab kaasa T-rakkude migratsioonile põletikukoldesse (Glaría ja Valledor, 2020). Antigeeni ära tundnud ja aktiveeritud T-rakkudel CD45 isovormi ekspressioon muutub RA-st ROks (Devi *et al.*, 2017).

Aktivatsiooniga samaaegselt hakkavad T-rakud ekspresseerima inhibitoorseid retseptoreid, mis on vajalikud, et immuunsüsteemi vastus vaibuks, vältides nii liigset koekahjustust. Mida kauem kestab antigeeniline stimulatsioon, seda suurem hulk inhibitoorseid retseptoreid on T-raku pinnal (Yi *et al.*, 2010). Üheks tuntumaks on PD-1 (*programmed cell death protein 1*, CD279), mida nimetatakse ka kurnatuse markeriks, sest on ülesreguleeritud T-raku pideval ja korduval kokkupuutel antigeeniga (näiteks krooniline infektsioon ja kasvaja). PD-1 takistab signaale, mis pärinevad TCR-ilt ja ko-stimulaatorsetelt retseptoritelt. Häirides nii T-raku tsütokiinide produktsiooni ja seeläbi nende efektorfunktsioone (Bettonville *et al.*, n.d.).

T-rakud, mis on läbinud rakujagunemist mitmel korral jõuavad lõpuks vananenud (*senescence*) seisundisse, mis tuleneb jagunemisega kaasnevast telomeeride lühenemisest. Selles seisundis on T-rakud alla reguleerinud ko-stimulaatorsed retseptorid ning hakanud ekspresseerima CD57. Vananenud rakud ei suuda enam jaguneda, kuid nende tsütokiinide tootmine pole häirunud, vaid hoopis muutunud, sest nad toodavad rohkem põletikulisi molekule (Zhang *et al.*, 2021).



**Joonis 2. T-raku aktivatsiooniks vajalikud 3 signaali.** Esimene signaal saadakse HLA ja TCR reaktsioonist, peale antigeeni äratundmist. Teine signaal tuleb ko-stimulaatorsetest retseptoritest, mis võimendavad vastust antigeeni suhtes. Viimane signaal tekib tänu tsütokiinidele, mida sekreteerivad nii T-rakk kui ka APC (siin juhul dendriitrakk). Joonis on skemaatiline, tehtud autori poolt, kasutades BioRenderit, põhinedes Lozano-Ojalvo *et al.*, 2015 tööle.

## 1.2.2. T-rakkude alapopulatsioonid

### 1.2.2.1. Tsütotoksilised T-rakud

Tsütotoksilised CD8<sup>+</sup> T-rakud (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) tunnevad ära antigeeni, kui seda esitab klass I HLA. CTL kaitsevad keha intratsellulaarsete patogeenide ja kasvajate eest, hävitades nakatunud või muutunud rakud (Andersen *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2021).

CTL efektorfunktsiooni aktiveerimises mängivad olulist rolli IL-12 (interleukiin-12, *interleukin-12*) ja teised pro-inflammatoorsed tsütokiinid, mis käivitavad rakus signaalirajad, pannes rakke ekspresseerima transkriptsioonifaktoreid T-bet (*T-box transcription factor*) ja esomesodermiin (*omesodemin*, EOMES) (Andersen *et al.*, 2006; Fixemer *et al.*, 2020).

CTLid panustavad organismi kaitsesse läbi mitme mehhanismi. Nad toodavad interferoon-gammat (*interferon-gamma*, IFN- $\gamma$ ), millega nad saavad aktiveerida teisi immuunsüsteemi rakke, näiteks makrofaage (Soudja *et al.*, 2014). Tundes ära antigeeni nakatunud/kasvajarakul hakkab CTL

vabastama graanuleid, mis sisaldavad perforiini ja gransüüme. Perforiin tekitab sihtmärkraku membraanis poore ja gransüümid lõhuvad muteerunud rakus valke, mis lõpuks suunab selle apoptoosi. Teiseks mehhanismiks, mida CTL organismi kaitseks kasutavad, on sihtmärkrakkudel retseptori CD95 aktiveerimine, mille tõttu käivitub nendes rakkude apoptoosi signaalide kaskaad (Hassin *et al.*, 2011).

#### 1.2.2.2. Abistaja T-rakud

Abistaja T-rakud (*T-helper cells*, Th) on üks suurimaid T-rakkude alapopulatsioone ning nende rolliks on vahendada nii rakulist kui ka humoraalset immuunvastust. Th rakud suudavad aktiveerida ja kohale kutsuda teisi immuunsüsteemi rakke, võimendades nii organismi vastust antigeeni suhtes, et sellest kiiremini vabaneda (Luckheeram *et al.*, 2012). Abistajarakud ekspresseerivad enamasti oma pinnal CD4 ko-retseptorit ja sarnaselt naiivsetele rakkudele tunnevad nad ära antigeeni kui seda esitab klass II HLA (Raphael *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2021).

Suurimad abistajarakkude alatüübid on Th1, Th2, Th17, follikulaar T abistajarakk (*follicular helper T-cell*, Tfh) ja regulatoorsed T rakud (*regulatory T-cells*, Treg). Kui on areng konkreetseks alatüübiks alanud, hakatakse pidurdama teisi arengusuundi (Raphael *et al.*, 2015). Joonisel 3 on kujutatud erinevad abistaja rakkude alatüübid.

Th1 rakud panustavad rakusiseste patogeenide elimineerimisse. Jagunevatest rakkudest areneb välja Th1 alatüüp kui aktivatsiooni keskkonnas on palju IL-12 (interleukiin-12, *interleukin-12*) ja IFN- $\gamma$  (interferoon-gamma, *interferon-gamma*). Nende tulemusel aktiveeruvad rakus eri transkriptsioonifaktorid, nende hulgas T-bet, mille toimetel hakkavad värsked Th1 rakud ise tootma IFN- $\gamma$  ja säilib IL-2 produktsioon, panustades nii ka CTL-de aktivatsiooni (Luckheeram *et al.*, 2012; Szabo *et al.*, 2000). Peale aktivatsiooni algab ka kemokiini retseptori CXCR3 (C-X-C motiiviga kemokiini retseptor 3, *C-X-C motif chemokine receptor 3*, CD183) ekspressioon, mis laseb rakkudel liikuda infektsioonipaika (Groom ja Luster, 2011). Th1 alatüüp suudab aktiveerida ja võimendada makrofaagide ja neutrofiilide fagotsütoosivõimet läbi rakk-rakk interaktsiooni kasutades CD40 ligandi (CD40L) ja IFN- $\gamma$  tootmist (Luckheeram *et al.*, 2012).

Th2 alatüüp aitab kaitsesse rakuväliste parasiitide, k.a usside eest, aktiveerides parasiite ründavaid eosinofiile oma tsütokiinide IL-4 (interleukiin-4, *interleukin-4*) ja IL-5 (interleukiin-5, *interleukin-5*) kaudu. Samuti osalevad Th2 humoraalses vastuses, sest suunavad B-rakke tootma IgE antikehi, läbi IL-4 produktsiooni ja saadud IgE on vajalik nuumrakkude aktivatsiooniks. Th2 vastust võib

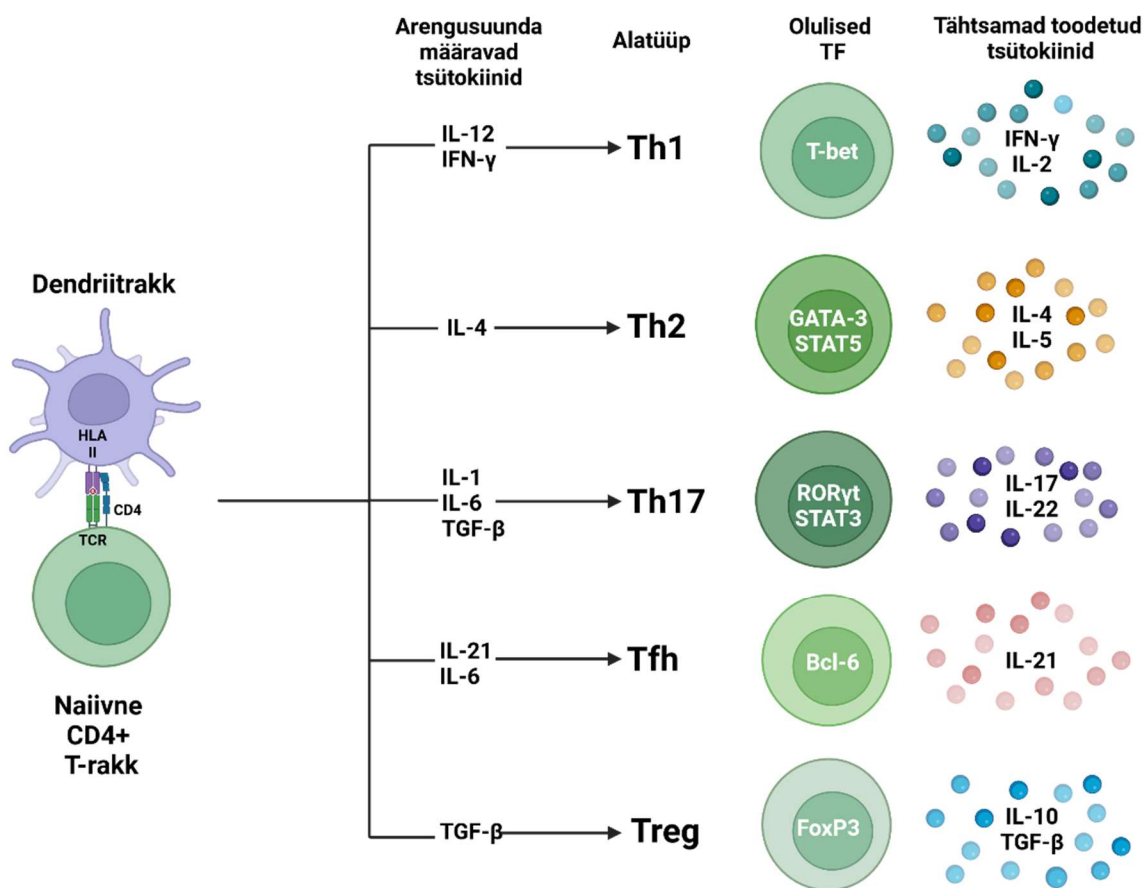
ka seostada allergiatega. Diferentseerumine Th2 alatüübiks algab kui jagunevad rakud puutuvad kokku IL-4-ga, mis paneb rakku tootma transkriptsioonifaktoreid nagu GATA3 (*GATA binding protein 3*) ja STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Diferentseerumise lõpus hakkavad Th2 rakud tootma tsütokiine nagu IL-4, IL-5 ja IL-13 (interleukiin-13, *interleukin-13*), need tsütokiinid stimuleerivad ning aktiveerivad teisi rakke ning supresseerivad teiste veel jagunevate rakkude arengut Th1 alatüübiks (Dong ja Flavell, 2000; Walker ja McKenzie, 2018).

Th17 alatüüp on vajalik, et immuunsüsteem saaks reageerida rakuvälistele bakteritele ja seentele. Th17 alatüüp areneb välja juhul kui rakkude arengut suunavad tsütokiinid IL-1 (interleukiin-1, *interleukin-1*), IL-6 (interleukiin-6, *interleukin-6*) ja transformeeriv kasvufaktor beeta (*transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ). Arenevas rakus aktiveeruvad transkriptsioonifaktorid ROR- $\gamma$  (*RAR-related orphan receptor gamma*) ja STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) ning nende toimele hakkavad Th17 rakud tootma tsütokiine IL-17 (interleukiin-17, *interleukin-17*) ja IL-22 (interleukiin-22, *interleukin-22*). Th17 rakkudele on iseloomulik ka kõrge CD161 ekspressioon, mis arvatakse mängivat rolli nende migratsioonis kudedesse (Cosmi *et al.*, 2008; Fergusson *et al.*, 2011). Th17 toodetud tsütokiinide abil suudavad nad tuua põletikukohta neutrofiile ja monotsüüte ja suurendada antimikroobsete ainete produktsiooni (Luckheeram *et al.*, 2012).

Folikulaar T-rakkude alatüüpi leidub lümfisõlmedes tekkivates idukeskustes (*germinal centres*). Nende ülesandeks on anda ko-stimulatoorne signaal (CD40L-CD40) aktiveerunud B-rakkudele, mis aitab kaasa nende affiinsusküpsemisele ning toota IL-21, mis on vajalik B-rakkudele jagunemiseks. Tfh raku suuna määravad ära tsütokiinid IL-6 ja IL-21 (interleukiin-21, *interleukin-21*), mille toimele ekspresseerub pinnal ICOS (*inductible T-cell costimulator*, CD278) retseptor. See omakorda suunab T raku tootma transkriptsioonifaktorit Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*). Sellega kinnitatakse arengusuund Tfh rakuks ning algab CXCR-5 (C-X-C motiiviga kemokiini retseptor 5, *C-X-C motif chemokine receptor 5*, CD185) ekspressioon, reguleeritakse alla CCR7, ning arenevad Tfh saavad liikuda lümfisõlmes asuvasse B-rakkude folliikulisse, kus nad aitavad idukeskusel moodustuda (Gustafson *et al.*, 2018; Johnston *et al.*, 2009).

Veel üks oluline grupp abistaja T-rakkude hulgas on regulatoorsed T-rakud, mis vastutavad perifeerse tolerantsi eest, takistades T-rakkude ja ka APC-de aktivatsiooni ja funktsioone (Vignali *et al.*, 2008). Tuumuses toimuva arengu käigus suunatakse enamik tugevasti autoantigeenidele reageerinud T-rakud rakusurma, kuid väike osa neist rakkudest jääb ellu ning areneb välja Treg-

ide populatsioon. Sarnane rakkude areng Tregiks võib toimuda ka perifeerias peale kokkupuudet autoantigeeniga. Mõlemal juhul on ellujäämisfaktoriks transkriptsioonifaktori Foxp3 (*Forkhead Box P3*) kõrge ekspressioonitase, mida indutseerib tsütokiin TGF- $\beta$  (Hoepli *et al.*, 2015). Valdav enamik Treg rakkudest on CD4+ ja neile on omane lisaks Foxp3-le ka transkriptsioonifaktori Helios ekspressioon (Getnet *et al.*, 2010). Treg rakke eristab teistest rakkudest ka madal CD127 retseptori ekspressioonitase. Tregidel on mitu mehhanismi, millega nad suudavad supresseerida teisi rakke. Nad ekspresseerivad pinnal kõrge affinsusega IL-2R (CD25), et tarbida ära IL-2, mis oleks teistele T-rakkudele aktivatsiooniks vajalik (Liu *et al.*, 2006; Workman *et al.*, 2009). Tregid sünteesivad tsütokiine IL-10 ja TGF- $\beta$ , mis toimivad efektorrakkudele supressiivselt, sest häiruvad signaalrajad, mis on vajalikud rakkude jagunemiseks ja tsütokiinide tootmiseks (Vignali *et al.*, 2008). Nendel rakkudel on ka kõrge CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*, CD152) ekspressioon, mis seondub APC-del oleva B7 ligandiga, häirides nii teistel T-rakkudel ko-stimulaatorse signaali saamist (Grover *et al.*, 2021).



**Joonis 3. Th rakkude alatüübid.** Kajastatud on tsütokiinid, mis määravad arengusuuna Th alatüübiks, lisaks on toodud välja iga alatüübi olulisemad transkriptsioonifaktorid (TF) ja toodetud tsütokiinid. Joonis baseerub Corripio-Miyar *et al.*, 2022 töö. Joonis on tehtud autori poolt kasutades BioRender programmi.

### 1.2.2.3. MAIT

MAIT rakud (*Mucosal-associated invariant T-cells*) on alapopulatsioon, mis on seotud organismi limaskestade ja maksaga. Nende TCR koosneb konserveerunud V $\alpha$ 7.2 segmendist ja  $\beta$ -ahelatest, mis tähendab, et need rakud ei tunne ära nii suurt antigeeni repertuaari kui teised T-rakud. Nende rakkude aktivatsioon ei kasuta klass I HLA, vaid MR1 (*MHC I related molecule*), mis tunneb ära bakterite ja seente poolt produtseeritud metaboliite. Enamik MAIT rakke on CD8+, lisaks on neil kõrge CD161 ekspressiooni tase. Kaitsesse saavad nad panustada otseselt kasutades gransüüme ja perforiini ning ka läbi TNF (kasvaja nekroosi faktor, *tumor necrosis factor*), IFN- $\gamma$  ning IL-17 sünteesi (*Le Bourhis et al.*, 2013; *Li et al.*, 2019).

### 1.2.2.4. Mälu T-rakud

Omandatud immuunsuse üks olulisi omadusi on mälu teke, mis tähendab, et sama antigeeni uuesti äratundmisel tekib immuunvastus kiiremini ja tugevamalt kui esmasel kokkupuutel. Pärast naiivsete rakkude aktivatsiooni läbivad nad klonaalse paljunemise perioodi ning kui patogeen on süsteemist eemaldatud, liigub enamik nendest rakkudest apoptoosi, kuid väike populatsioon nendest jääb ellu ja areneb edasi mälorakkudeks (*Sallusto et al.*, 2004). Arvatakse, et mehhanism, mis määrab ära arengu efektorrakuks või mälorakuks, sõltub aktivatsiooni signaalide tugevusest ning kestvusest, rõhutades tsütokiini IL-2 rolli selles nii sekretsiooni tugevuse kui ka retseptorite arvu suhtes. Nõrk signaal suunab rakke arenema mälu populatsioonideks (*Boyman ja Sprent*, 2012; *Sallusto et al.*, 2004). Vananedes mälu-rakkude hulk kasvab, sest on olnud rohkem nii esmaseid, kui ka korduvaid kokkupuuteid erinevate antigeenidega (*Sallusto et al.*, 2004).

T-rakkude mälorakkude populatsioonide hulka kuuluvad: tsentraalsed mälorakud, efektor mälorakud ning TEMRA (Terminaalselt diferentseerunud efektor mälu T-rakud, *terminally differentiated effector memory T-cells*) rakud. Tsentraalsetele mälu rakkudele (*central memory cell*, CM) on iseloomulik CCR7 ekspressiooni taastumine, võimaldades neil liikuda sekundaarsetesse lümfoidsetesse organitesse nagu naiivsed rakud, seal võivad nad uuesti kohata oma antigeeni ja taasaktiveeruda (*Sathaliyawala et al.*, 2013). Efektor mälorakud (*effector memory cell*, EM) ei ekspresseeri enam CCR7, mille tõttu esineb neid rohkem perifeerias (*Saule et al.*, 2006). Kumbki neist populatsioonidest CD45RA uuesti ei ekspresseeri. TEMRA rakud on alapopulatsioon, mis ei ekspresseeri CCR7, kuid on hakanud uuesti ekspresseerima CD45RA. TEMRA rakud on huvitav populatsioon oma funktsioneerimise poolest. Sarnaselt teiste mälorakkudele suudavad nad kiirelt reageerida antigeenile, olles tsütotoksilisem teistest mälu rakkudes, tootes rohkem perforiini ja

granosüümi ja sekreteerides rohkem pro-inflamatoorseid tsütokiine, ning samal ajal nende jagunemisvõime on vähenenud, mis on omane vananenud populatsioonile (Guo *et al.*, 2023). TEMRA rakku loetakse lõplikult diferentseerunuks, kui ta on kaotanud ko-stimulatoorse retseptori CD27, sest ilma selleta pole rakk enam jagunemisvõimeline (Kizmaz *et al.*, 2023).

### 1.2.3. T-rakkude uurimise vajalikkus

T-rakkude immuunfenotüüpiseerimine annab olulist infot, mida saab kasutada nii teaduses ja sellel on ka kliinilisi rakendusi. Seda on võimalik kasutada haiguste diagnoosimisel, jälgimisel, ravide või teraapiate valimisel.

Üks grupp haigusi, kus kasutatakse rakkude immuunfenotüüpiseerimist koos geneetiliste testidega, on primaarsed immuunpuudulikkused (primary immunodeficiencies, PID). Patsientidele on iseloomulikud pidevad nakatumised ja nakkushaiguste raske põdemine, kuna on toimunud geneetilised muutused, mis häirivad immuunsüsteemi tavapärasest toimimist. Immuunfenotüüpiseerides oleks võimalik kiiresti tuvastada, millised immuunrakkude populatsioonid on häiritud (Salzer *et al.*, 2019).

T-rakkude fenotüüpiseerimine on oluline HI-viiruse (*Human immunodeficiency virus*, HIV) puhul. HIV põhjustab patsiendi Th rakkude hukkumise, vähendades immuunvastust, kuni kujuneb välja omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS). Immuunfenotüüpiseerimist ei rakendata HIV nakkuse diagnoosiks, kuid seda kasutatakse, et määrata haiguse staadiumit, vaadates patsientide CD4+ T-rakkude arvu, ning peale ravi alustamist, selle edukust, sest CD4+ T-rakkude hulk taastub (*AIDS ja HIV | Terviseamet*, n.d.; Clift, 2015).

T-rakkude immuunfenotüüpiseerimine mängib olulist rolli kasvaja vastaste teraapiate valimisel. Kasvajatel on mehhanismid, mis aitavad neil vältida T-rakkude vastust: reguleerides alla antigeeni ja HLA ekspressiooni või läbi supressiivse keskkonna loomise. PD1-L, mis seostudes T-rakkude pinna retseptoritega, põhjustades T-rakkude kurnatust (Spranger, 2016). Sellisel juhul saab kasutada anti-PD-1 antikehasid, vältides T-rakkudes kurnatuse teket ja pikendades immuunvastust kasvajate vastu. Enne selle teraapia rakendamist on aga vaja ära määrata juba kurnatud rakkude hulka, sest kui T-rakud ekspresseerivad juba kõrget PD1 taset, siis võib teraapiast saadav kasu olla väike. Kurnatud T-rakkude leidmiseks saab kasutada immuunfenotüüpiseerimist (Edwards *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2015).

## 1.3. Voolutsütomeetria

Voolutsütomeetria on mitmekülgne tehnoloogia, mida kasutatakse nii immuunfenotüpiseerimiseks kui ka näiteks mikrobioloogiliste proovide analüüsiks. Selle tugevus seisneb võimes analüüsida suurt hulka rakke individuaalselt, uurides igaühe puhul omadusi nagu suurus, granulaarsus ja proovi eelneva töötlemise korral ka rakupinna markerite ekspressiooni. Seda tehnoloogiat kasutatakse nii teadus- kui ka kliinilistes laborites (McKinnon, 2018).

### 1.3.1. Spektraalse voolutsütomeetri ehitus ja tööpõhimõte ning erinevus konventsionaalsest voolutsütomeetrist

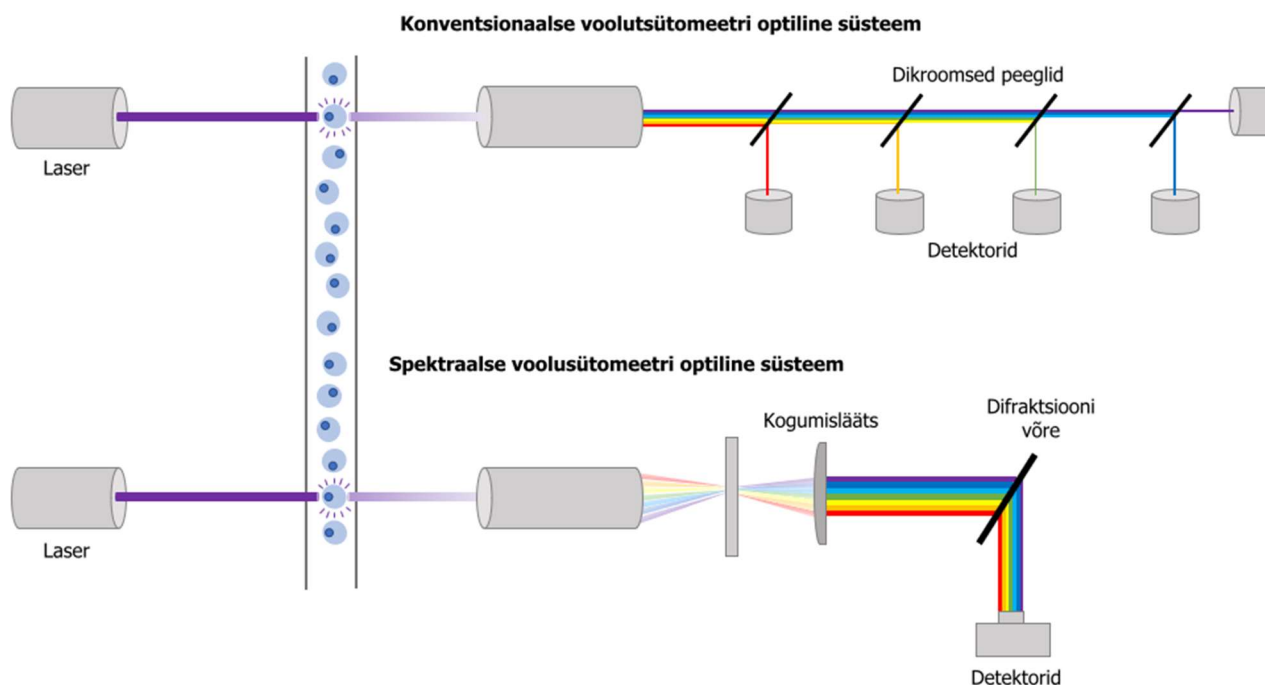
Spektraalne voolutsütomeeter on sarnane konventsionaalsete voolutsütomeetritega, omades samu kolme põhiosa: vedeliku-, optiline ning elektrooniline süsteem (Nolan ja Condello, 2013).

Rakud liiguvad läbi terve masina vedelikusüsteemis, mis kasutab hüdrodünaamilist fookustamist ning tagab selle, et rakud läbiksid laserkiiri ükshaaval. Kasutades selleks kahte eri kiirusel voolavat vedelikku (Suthanthiraraj ja Graves, 2013).

Optiline süsteem eristab konventsionaalset ja spektraalset voolutsütomeetrit, joonisel 4 on neid võrreldud. Mõlemad kasutavad kindlatel lainepikkustel töötavaid lasereid. Enamasti on masinas kas mõni või kõik järgnevatest laseritest: 355 nm (ultravioletne), 405 nm (violettne) 488 nm (sinine), 552 nm (roheline), 561 nm (rohekas-kollane) ja 640 nm (punane). Raku liikudes läbi laserkiire ergastuvad fluorokroomid ja kiirgavad valgust. Raku laserist möödumisel tekkinud valguse muutuste abil tuvastatakse ka nende suurus ja granulaarsust, kasutades detektoreid, mis mõõdavad valguse siirduvust. Konventsionaalse voolutsütomeetria puhul suunatakse mõõdetav valgus dikromaatilisi peegleid fotodetektorile. Need peeglid juhivad kindla lainepikkusega signaali vastavale detektorile, lastes ülejäänud valgusel edasi liikuda järgmistele detektoritele (McKinnon, 2018). Spektraalses voolutsütomeetris kogub kogumislääts (*collimating lens*) algse valguse kokku ja suunab selle läbi selle läbi difraktsioonivõre (*gratingut*). See murrab valguse terveks spektriks, lahutades värvid üksteisest, mis seejärel liiguvad detektorite paneeli (Nolan ja Condello, 2013). Selle toimumist kahes erinevas voolutsütomeetris on kujutatud joonisel 5.

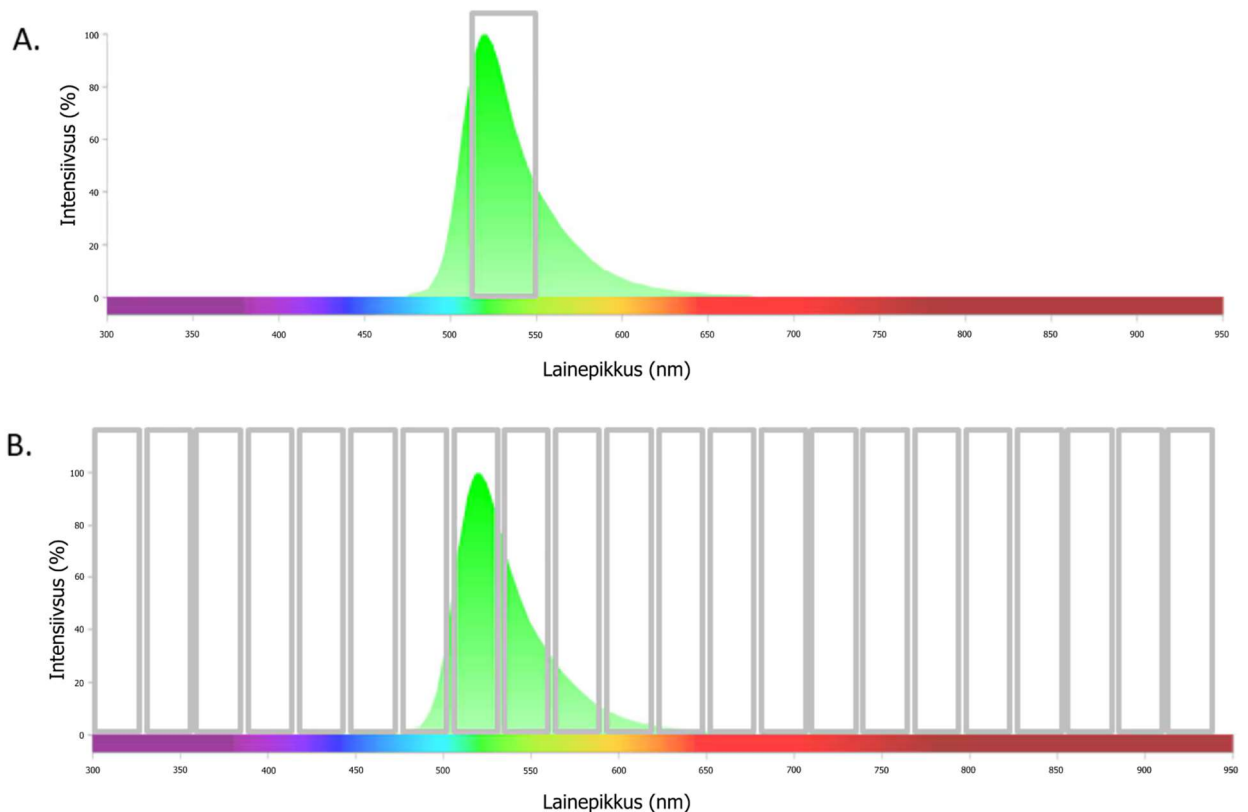
Detektoriteks on fotovõimendid (*photomultiplier tube*, PMT) ja fotodiodid, millest viimased on valguse suhtes vähem tundlikud ja kasutatakse peamiselt tugevama edasisiirde (FSC) signaali tuvastamiseks. Fotovõimendid suudavad tuvastada palju nõrgemaid signaale ja seetõttu

kasutatakse neid kõrvalsiirde (SSC) ja fluoretsentsvalguse tuvastamiseks (Rowley, 2023). Kui valgus jõuab detektorini, vabaneb elektrisignaal – mida intensiivsem valgus, seda tugevam signaal. Sealt hakkab osalema voolutsütomeetri elektrooniline süsteem. Detektorilt mõõdetud elektrisignaal konverteeritakse ADC (analoog-digitaalmuundur, *analog to digital converter*) abil, selliseks, mis võimaldaks andmeid arvutis visualiseerida, et saaks toimuda analüüs. (*Electronics of a Flow Cytometer - EE, n.d.*).



**Joonis 4. Konventsionaalse ja Spektraalse voolutsütomeetria optiliste süsteemide komponentide võrdlus.** Vedelikusüsteemi abil läbivad rakud valgusallika (laseri). Konventsionaalses voolutsütomeetris mõõdetud valgussignaal filtreeritakse dikromaatiliste peeglite enne kui detektoriteni jõuab. Spektraalses voolutsütomeetris kogutakse valgus läbi kogumislääts enne kui see liigub läbi difraktsioonivõre, jõudes detektoriteni samaaegselt. Joonis pärineb *Kalser, 2023* artiklist, tõlgitud autori poolt.

Kuna spektraalse voolutsütomeetriga mõõdetakse tervet värvispektrumit korraga, lubab see paneelis kasutada rohkem fluorokroome, muutes need analüüsil üksteisest kergemini eristatavaks. Seetõttu erineb ka hilisem signaalide analüüs konventsionaalsest voolutsütomeetrist (*Robinson et al., 2023*). Enne analüüsi peab iga kasutatava fluoretsentsimarkeri spekter olema eraldiseisvana mõõdetud (*Niewold et al., 2020*).



**Joonis 5. Detektorite kasutuse erinevus konventsionaalse ja spektraalse voolutsütomeetri vahel.** A) on kujutatud konventsionaalses voolutsütomeetris kasutatavat ühe detektori süsteemi, mis mõõdab vaid fluorokroomi kiirguse maksimumi B) on spektraalse voolutsütomeetris kasutatav paljude detektori kanalite süsteem, mis võimaldab tervet fluorokroomi kiirguse spektrit tuvastada. Joonis pärineb Spectral Flow Cytometry Fundamentals - EE, *n.d.* artiklis, tõlgitud autori poolt.

Konventsionaalses voolutsütomeetrias kasutatakse fluorestsensvärvide eristavaks analüüsiks kompensatsiooni. Igale fluorokroomile määratakse vastavalt tema emissiooni maksimumile primaarne detektor, kuid kuna emissioon on tihti laiem ja signaal „voolab“ ehk on ka teistes detektorites leitav. Kompensatsioonil tuvastatakse, kui palju ühest signalist on leitav teises kanalis ning see lahutatakse (Niewold *et al.*, 2020). Spektraalne voolutsütomeetria kasutab fluorestsentsi värvide eraldamiseks „*unmixingut*“: eelnevalt iseseisvalt mõõdetud signaalidest ehitatakse spektraalne referentside raamatukogu. Proovile saab rakendada infot raamatukogust ning matemaatiliste algoritmidega eristatakse mõõdetud fluorokroomide signaalid. Oma teistsuguse analüüsimeetodika tõttu võimaldab spektraalne voolutsütomeetria ka rakkudelt tulevat autofluorestsentsi kergesti tuvastada. Kasutades proovi, kuhu fluorokroomide pole lisatud, valida

huvipakkuv populatsioon, siis masin saab detekteerida autofluoretsentsi ja eemaldada selle mõju analüüsist (Robinson *et al.*, 2023).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

Optimeerida antikehadega värvinguprotokoll spektraalsele voolutsütomeetrile:

- a. Testida fikseerimis- ja permeabiliseerimispuhvri mõju antikehade värvingule
- b. Titreerida antikehasid, leides neile optimaalsed lahjendused
- c. Töötada välja paneel, mis lubaks immuunfenotüpiseerida T-lümfotsüüte nende rakusisete ja pinnamarkerite põhjal

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Valimi kirjeldus

Töös kasutati Tartu ülikooli Kliinikumi verekeskuse nelja vabatahtliku doonori (N32, N56, M60 ja N61) leukotsüütide kihist pärit rakke. Lisaks kaasati töösse veel nelja inimese leukotsüüte kihist eraldatud rakke (MP 1-4). Töö teostamiseks on inimuuringute eetikakomitee väljastanud loa numbriga 362/M-6.

#### 2.2.2. Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude eraldamine ja külmutamine

Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) eraldamine toimus Ficolli gradient-tsentrifugimise meetodil. Ettevalmistuste ajal jagati veri 15 ml kaupa 50 ml katsutitesse (Nerbe plus), millele lisati samas proportsioonis  $\text{Ca}^{2+}$  vaba PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Corning). Eraldamise protsess algas 15 ml Ficolli lahuse (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) lisamisega eelnevalt 50 ml katsuti põhja, millele siis lisati vere ja PBS-i segu, ilma et kihid seguneksid. Katsuteid tsentrifugeeriti toatemperatuuril 30 min  $400 \times g$  (Eppendorf 5810R, rootor A-4-62) juures pidurita ja kiirenduseta. Seejärel tõsteti Ficolli pinnale kogunenud rakud uude 50 ml katsutisse, mida pesti 40 ml PBS-ga ning tsentrifugiti toatemperatuuril  $200 \times g$  juures 10 minutit. Pesu korrati  $300 \times g$  juures 10 minutit. Lõpuks eemaldati PBS ja rakud võeti üles 10 ml RPMI-s. PBMCde lugemiseks võeti 18  $\mu\text{l}$

rakususpensiooni lisati 2 µl akridiinoranž-propiidiumjodiid värvi (*Acridine Orange*, Logos), ning mõõdeti Luna rakulugeriga (Luna, *Dual Fluorescence Cell Counter*, Logos Biosystems).

PBMCd jaotati krüoviaalidesse (Greiner bio-one) tihedusega  $20 \times 10^6$ /ml,  $30 \times 10^6$ /ml,  $40 \times 10^6$  /ml või  $50 \times 10^6$  /ml . Rakkude külmutamiseks valmistati 20% DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, PanReac AppliChem) lahus, mis lisati tilgahaaval rakususpensioonile, kuni saavutati lahuses kontsentratsioon 1:1. Krüoviaalid asetati 24 tunniks  $-80^\circ\text{C}$  juurde ning seejärel tõsteti nad ümber vedela lämmastiku tünni.

### **2.2.3. PBMCde sulatamine**

Krüoviaal eemaldati vedela lämmastiku tünnist ja asetati transpordiks jääle. Vesivannil sulatatud rakususpensioon tõsteti 15 ml katsutisse (Nerbe Plus) ja krüoviaali pesti 1 ml RPMI toasooja söötmega - RPMI-le on eelnevalt lisatud 10%  $56^\circ\text{C}$  juures inaktiveeritud veise loote seerumit (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco) ja 1% lahust, mis sisaldas: penitsilliini 10000 ühikut/ml, streptomütsiini 10mg/ml (Corning). Kui PBMC-sid sulatai paneelide jaoks, lisati RPMI söötmesse ka DNase I (Applichem), kuni saavutati lõppkontsentratsioon  $10 \mu\text{g/ml}$  kohta. Söödet lisati mahuni 10 ml, millele järgnes rakkude tsentrifugeerimine 10 min  $200 \times g$  juures. Rakkudelt eemaldati supernatant ja nad võeti üles RB-s (*Running Buffer*). [1 x PBS, 5% BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich) ja 500mM EDTA (PanReacAppliChem)].

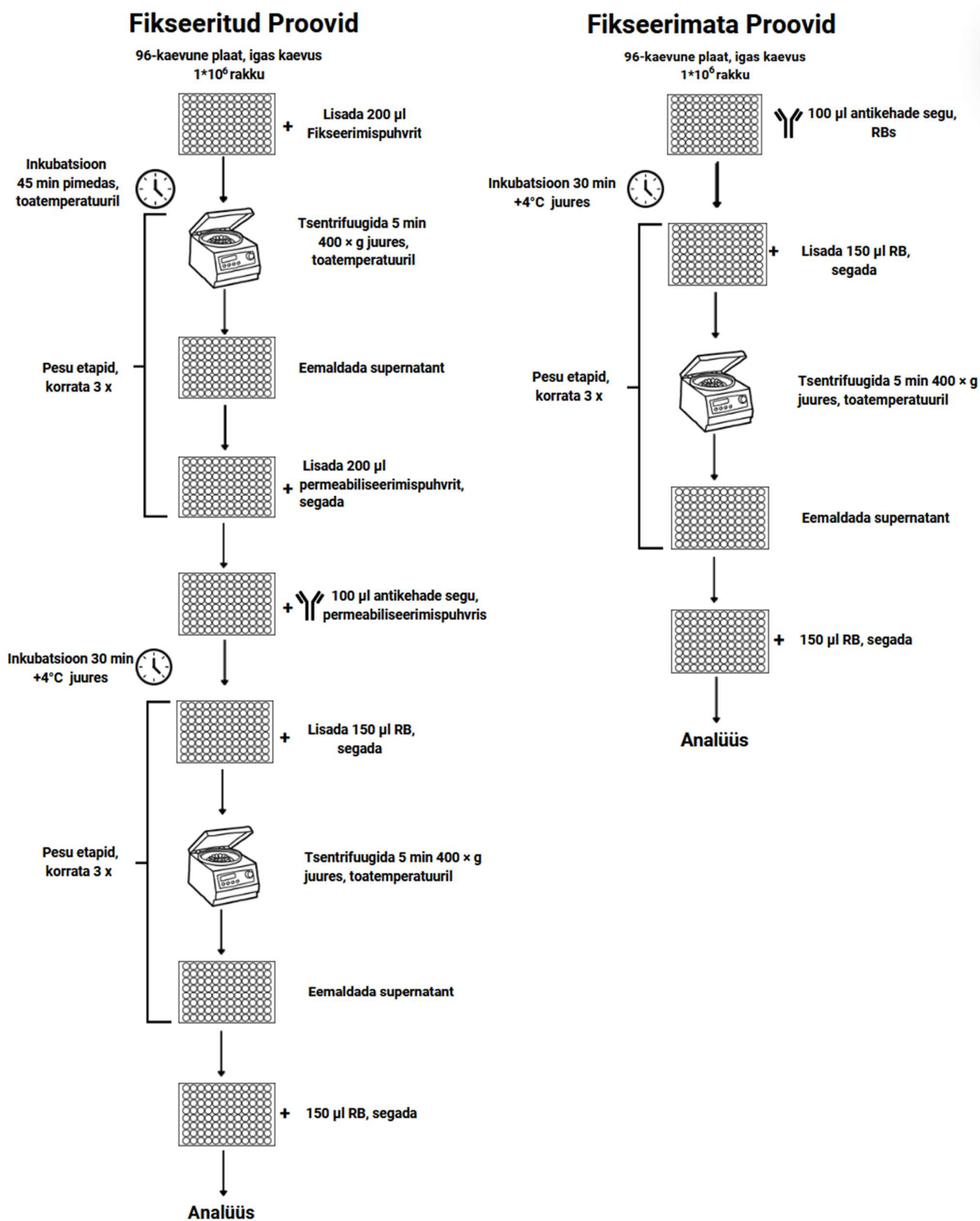
### **2.2.4. PBMCde fikseerimine, permeabiliseerimine ja värving**

Esimeste katsete eesmärk oli tuvastada antikehad, mis on spetsiifilised raku pinnaantigeenide suhtes ning mida on võimalik värvida ka rakusiseselt. Iga antikehade segu valmistati ette fikseeritud ning permeabiliseeritud ja fikseerimata PBMC-dele. Ühes segus oli maksimaalselt neli antikeha, lahjenduses 1:100. Segud valmistati põhimõttel, et iga antikeha fluokroomi ergastaks oma laser, vähendades nii spektrite kattumist. PBMC-d jaotati 96-kaevulises V-põhjalises plaadis (Greiner) olevatesse kaevudesse, millest igaüks sisaldas 1 miljonit rakku  $200 \mu\text{l}$  RB-s. Plaati tsentrifuugiti 10 minutit  $300 \times g$  juures toatemperatuuril ja RB eemaldati. Rakud fikseeriti ja permeabiliseeriti kasutades *True-Nuclear<sup>TM</sup> Transcription Factor Buffer* (BioLegend) komplekti. Ülevaade kahe erineva protokolliga sammudest on toodud joonisel 6.

Igal katseplaadil olid kompensatsioonikaevud, „*single stain*“ kontrollide jaoks, millest igaüks sisaldas 1 tilk kompensatsioonikerasid (UltraComp eBeads, Invitrogen) ja 1  $\mu$ l antikeha. Kompensatsioonikaev tehti igale kasutatavale antikehale. Need võimaldasid reguleerida ja sättida optimaalset laserite võimsust, et tuvastada, millistel laseri pingetel oleks terve signaal loetav. Kompensatsioonikerad koosnevad kahest populatsioonist: üks, mis on kaetud liigi spetsiifiliste antikehadega, kuhu saavad seonduda katses kasutatavad fluorokroomiga konjugeeritud antikehad, teine populatsioon töötab kui negatiivne kontroll, sest sealt puuduvad antikehad ja ei saa seondumist toimuda. Lisaks nendele oli igal plaadil ka kontrollkaev, kus rakke ei töödeldud antikehadega, mis annaks infot rakkude autofluoresentsi kohta.

Antikehad, mida selles faasis testiti ning, kas töötasid paremini fikseeritud või fikseerimata rakkudel on näha tabelis 4.

Optimiseerimise käigus leiti, et permeabiliseerimise etapp põhjustab taustasignaali märgatavat tõusu, edasistes katsetes, kus ei kasutatud rakusiseseid antikehi, jäeti permeabiliseerimise etapp ära ning asendati RB-ga.

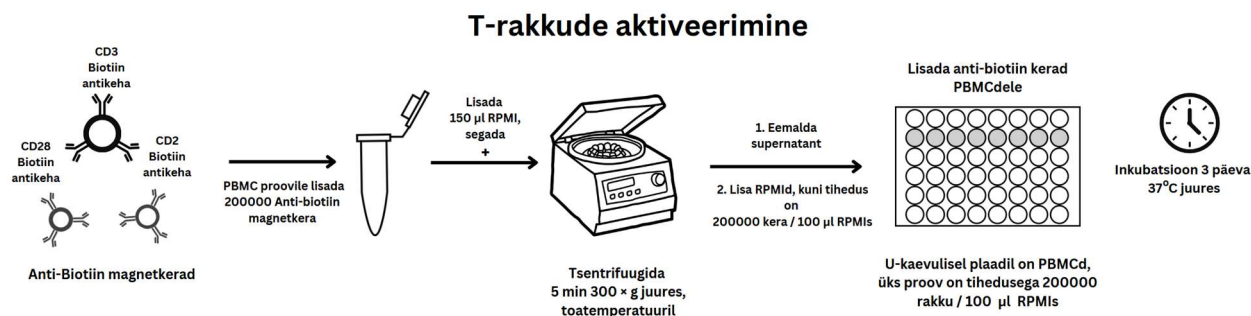


**Joonis 6. PBMC värvimise protokollid.** Vasakul on kujutatud protokollisammud, et rakke fikseerida ja permeabiliseerida. Paremalt on protokoll rakkudele, mis läbisid fikseerimise, kuid ei läbinud permeabiliseerimist. Joonis on loodud autori poolt, kasutades programmi Canva.

## 2.2.5. T-rakkude aktiveerimine aktivatsiooni-inhibitsiooni-ning proliferatsioonimarkerite värvimiseks

T-rakkude aktiveerimiseks kasutati kommertsiaalkiti (T Cell Activation/Expansion Kit human, Milteney), mis põhineb CD2-Biotin, CD3-Biotin ja CD28-Biotin antikehade seostumisel T-rakkudega. Antikehad seotakse kiti ettevalmistusel anti-biotiin magnetkerade külge ning rakkudele lisades, toimivad need, kui antigeeni esitavad rakud, aktiveerides PBMCde hulgas olevad T-rakud. Antud reagent oli teiste laboriliikmete poolt vastavalt tootjapoolsele protokollile kokku segatud.

Rakud sulatati nagu eelnevalt kirjeldatud, teostati lugemine ning võeti üles RPMI söötmes tihedusega 200 000 rakku 100 µl. Seejärel tõsteti rakud U-põhjalisse plaati (Corning). Aktivatsioonikerasid kasutati 1:1 suhtes rakkudega ning tõsteti 1.5 ml katsutisse (Eppendorf). Järgnes pesu, kus keradele lisati 150 µl RPMI söödet ning tseentrifugeeriti 5 min 300 × g juures (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, rootor FL066). Supernatant aspireeriti ning lisati 100 µl RPMId seejärel pipeteeriti segu rakkudele ja saavutati lõppmaht 200 µl. Plaati inkubeeriti 3 päeva koekultuurikapis 37°C (Sanyo) kraadi, 5-10% CO<sup>2</sup> juures. Joonisel 7 on need sammud kujutatud visuaalselt.



**Joonis 7. T-rakkude aktivatsiooni protokollisammud.** Rakud aktiveeriti kasutades „Milteney T Cell Activation/Expansion Kit Human“ kommertsiaalkiti. Joonis on tehtud autori poolt kasutades Canvat.

Peale T-rakkude aktivatsiooni protokollisammude läbiviimist kasutati saadud rakke, nagu eelnevas ja järgnevas peatükis mainitud, et leida optimaalsed tingimused ja kontsentratsioon aktivatsioonimarkerite tuvastamiseks PBMC rakkudel. Edasistes katsetes aktivatsiooniga ei jätkatud.

## 2.2.6. Antikehade optimaalse tiitri leidmine

Siinses katsete järgus oli eesmärgiks leida madalaim antikehade kontsentratsioon, mille juures mõõdetav signaal oleks selgesti eristatav. V-põhjalisele plaadile loodi kaheksast kaevust koosnev lahjendusrida RB-ga, Juhul, kui uuritava antikeha fluorokroom kuulus NovaFluor™ (ThermoFisher) hulka, lisati esimesse kaevu 5 µl antikehale 94 µl RBle liskas ka 1 µl Cellblox lahust (ThermoFisher). Valmis lahjendusridadele lisati fikseerimata, ainult fikseeritud või fikseeritud ja permeabiliseeritud PBMCd ( $1 \cdot 10^6$  rakku/50 µl RBs), lõppmaht kaevus oli 100 µl ning antikehade lõppkontsentratsioonid olid 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 ja 1:5120. Kaevud, kuhu lisati fikseerimata PBMC, lasti inkubeerida 1h, peale mida rakud fikseeriti nagu kirjeldatud joonisel 6, kuid permeabiliseerimispuhver on asendatud RB-ga. Plaadil oli lisaks negatiivne (autofluoresentsi) kontroll, milles olid ainult rakud.

Haruldastele rakupopulatsioonidele omastele markerite ja rakusiseste markerite puhul (Helios, FoxP3, EOMES, Ki-67, CD25, TCRV $\alpha$ 7.2, ICOS), lisati pärast lahjendusrea valmimist juurde 1:100 lahjenduses kas ainult CD3 või CD4 või kõik kolm antikeha: CD3, CD4 ja CD8. Nende lisamine aitas analüüsil, sest oli lihtsam eristada suuri T-rakkude populatsioone, kelle hulgast võiks leida vähelevinud populatsioone.

Plaat inkubeeriti 24h +4°C juures ning pesti 3x 150 µl RB tsentrifugeerides 5 min 400 × g toatemperatuuril. Seejärel teostati mõõtmise spektraalse voolutsütomeetriga.

## 2.2.7. T-rakkude paneeli loomine spektraal voolutsütomeetritele

PBMCd sulatati nagu kirjeldati peatükis 2.2.3. ning loendati kasutades rakulugerit Luna. PBMCd resuspendeeriti tiheduseni  $2 \cdot 10^6$  rakku 25 µl RPMIs ning jaotati 25 µl kaupa polüpropüleen katsutitesse (Corning). Proovidele lisati 10 µl FcR blokeerimis reagenti (Miltene). Seejärel lisati TCRgd antikeha ning proove inkubeeriti 10 min 37°C kraadises inkubaatoris, sest see antikeha töötab paremini, kui seondub enne teisi. Pärast mida lisati 15 µl (Segu 1, Tabel 1) ja inkubeeriti uuesti 10 min 37°C kraadi juures. Peale inkubatsiooni lisati proovile 40 µl (Segu 2, Tabel 1) ning proovi inkubeeriti 1h 4°C juures. Järgnes pesu, kus proovile lisati 2ml RB ning tsentrifugeeriti 7 min 300 × g juures, seejärel vedelik eemaldati ja lisati 200 µl fikseerimispuhvrit ning proovid tõsteti polüstüreen katsutitesse (Corning) ning hoiti 45 min toatemperatuuril, peale mida nad pesti uuesti nagu eelnevalt kirjeldatud. Proovidele lisati 100 µl (Segu 3, Tabel 1) ja katsutid jäeti üleöö inkubeerima 4°C juures. Järgmisel päeval pesti proove ning lõpuks lisati katsutisse 150 µl RB-d ja tõsteti ümber V-põhjalisele plaadile, peale mida toimus mõõtmise spektraalse voolutsütomeetriga.

**Tabel 1. Pinnamarkerite paneelis kasutatavate antikehade segud.** Välja on toodud kasutatud antikeha, kloon ja selle külge konjugeeritud fluorokroom ning tiiter.

	<b>Antikeha</b>	<b>Kloon</b>	<b>Fluorokroom</b>	<b>Tiiter</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
	TCRgd	B1.1	PerCP-eFluor 710	80	1.25
<b>Segu 1</b>	CXCR5	J252D4	BV750	160	0.625
	CXCR3	G025H7	PE-Fire 810	40	2.5
	CCR7	G043H7	APC-Fire750	640	0.15625
	<b>Toode</b>			<b>Tootja</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 1 lahus</b>	RPMI koos DNase I-ga			Nerbe Plus + Applichem	12
	<b>Antikeha</b>	<b>Kloon</b>	<b>Fluorokroom</b>	<b>Tiiter</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 2</b>	IgD	IA6-2	BV480	1000	1
	CD127	A019D5	BV510	160	0.625
	HLA-DR	LN3	NovaFluor B 660	320	0.3125
	CD25	M-A251	PE-Fire 640	320	0.3125
	TCR Va7.2	3C10	AF 647	160	0.625
	CD27	O323	AF700	1000	1
	CD38	HB-7	APC-Fire 810	160	0.625
	<b>Toode</b>			<b>Tootja</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 2 Lahus</b>	RB			-	24.5
	Brilliant Stain			BD biosciences	10
	Cellblox			ThermoFisher	5
	<b>Antikeha</b>	<b>Kloon</b>	<b>Fluorokroom</b>	<b>Tiiter</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 3</b>	CD123	6H6	SuperBright436	640	0.15625
	CD161	HP-3G10	PacificBlue	1000	0.1
	CD45RA	HI100	BV570	320	0.3125
	CD56	HCD56	BV650	160	0.625
	CD20	2H7	FITC	1000	0.1
	CD4	SK3	Spark Blue 550	640	0.15625
	CD14	NB555	AF532	320	0.3125
	CD3	UCHT1	Spark Blue 574	1000	0.1
	CD24	SN3	StarBright Blue 700	640	0.15625
	CD8	LT8	StarBright Blue 810	640	0.15625
	IgM	MHM-88	PE-Cy7	2000	0.05
	CD21	Bu32	APC	1000	0.1
		<b>Toode</b>			<b>Tootja</b>
<b>Segu 3 Lahus</b>	RB			-	313.2
	Brilliant Stain			BD biosciences	40

Kuigi algselt oli soov kasutada paneelis samaaegselt raku pinna- ja sisemarkereid, siis peale mõõtmisi selgus, et need paneeli versioonid polnud edukad. Protsessi käigus olid pinnamarkerite signaalid tugevalt häirunud, mille tõttu oli rakupopulatsioonide eraldamine võimatu (lisa 2). Sisemarkerite jaoks loodi teine paneel.

T-raku siseste markerite paneel algab sarnaselt pinnamarkerite paneeliga, kuid algusest peale kasutati polüstüreen katsuteid. Seejärel rakud fikseeriti ja pesti nagu eelnevalt kirjeldatud. Fikseeritud PBMC-dele lisati 100 µl segu 1 (segu 1, Tabel 2) ning proove inkubeeriti üleöö. Järgmisel päeval proove pesti 200 µl permeabiliseerimis puhvriga ja lisati 100 µl rakusete markerite segu (segu 2, Tabel 2). Sellele järgnes 1h inkubatsioon 4°C juures, peale mida rakke pesti 2 ml RB-ga ning pärast pesu lisati rakkudele 150 µl RB ja viidi läbi mõõtmine spektraalse voolutsütomeetriga.

**Tabel 2. Sisemarkerite paneelis kasutatavate antikehade segud.** Tabelis on kirjas antikeha, kloon ja selle külge konjugeeritud fluorokroom ning tiiter.

	<b>Antikeha</b>	<b>Kloon</b>	<b>Fluorokroom</b>	<b>Tiiter</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 1</b>	CD3	UCHT1	Spark Blue 574	1000	0.1
	CD4	SK3	Spark Blue 550	640	0.15625
	CD8	LT8	StarBright B 810	640	0.15625
	<b>Toode</b>			<b>Tootja</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 1 lahus</b>	RB			-	101
	<b>Antikeha</b>	<b>Kloon</b>	<b>Fluorokroom</b>	<b>Tiiter</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 2</b>	EOMES	WD1928	AF660	1:2000	0.05
	FOXP3	206D	SparkNIR 685	1:1000	0.1
	HELIOS	22F6	PE	1:1000	0.1
	Ki-67	20Raj1	PE-eFluor 610	1:1000	0.1
	T-bet	4B10	BV605	1:320	0.3125
	<b>Toode</b>			<b>Tootja</b>	<b>µl 1 proovi kohta</b>
<b>Segu 2 Lahus</b>	Permeabiliseerimis Puhver			BioLegend	102

## 2.2.8. Spektraalse referentsiraamatukogu loomine

Samaaegselt paneelidega loodi spektraalne referentsiraamatukogu, kuhu kuuluvad iga paneelis kasutatava antikeha fluorentsist saadud signaalid. Referentsiraamatukogu on vajalik, et analüüsi faasis saaks antikehadelt saadud signaale üksteisest eristada.

Selleks kasutati 96-kaevulist V-põhjalist plaati, kuhu tehti „*single stain*“ kaevud, millest igaüks sisaldas 1 tilk kompensatsioonikerasid ja antikeha vastavalt selle optimaalsele kontsentratsioonile. Kuna paneelis läbivad rakud fikseerimist peale teatud antikehadega värvimist, mis võib fluorokroomi signaali muuta, siis võimalikult täpse signaali mõõtmiseks läbisid antikehad sama protsessi. Antikehad (mis kuulusid segusse 1 ja 2, tabel 1) lisati kompensatsioonikeradele, inkubeeriti 1h 4°C ja seejärel fikseeriti, nagu kirjeldatud peatükis 2.2.4, neid veel pesti enne kui toimus mõõtmine spektraalse voolutsütomeetriga. Kui antikehad olid mõeldud fikseerimise läbinud rakkudele (segu 3, tabel 1 ja segu 1 ja 2, tabel 2), siis spektraalse referentsi mõõtmiste jaoks neid peale 1h värvingut ei fikseeritud, vaid pesti ja mõõdeti spektraalse voolutsütomeetriga.

## 2.2.9. Spektraalse voolutsütomeetriga mõõtmised

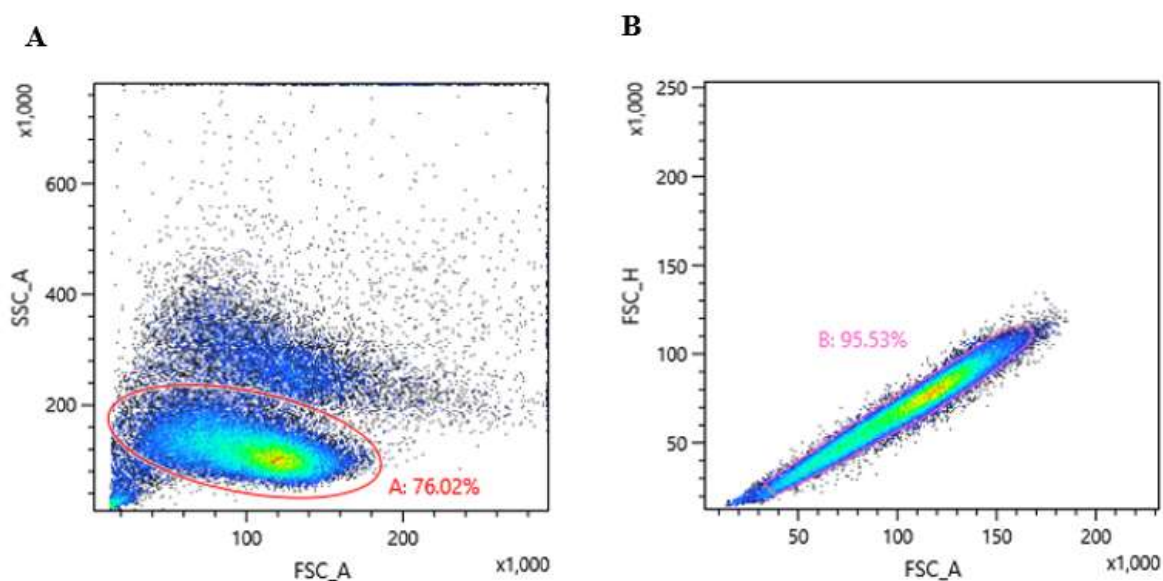
Töös kasutati spektraalset voolutsütomeetrit (*ID7000 Spectral Cell Analyzer*, Sony), millel on 4 laserit, mis töötavad sagedustel 405 nm (lilla), 488 nm (sinine), 561 nm (kollakasroheline) ja 638 nm (punane), detektoreid on masinal 112. Enne proovide analüüsi viidi masinal läbi kvaliteedikontrollid, kasutades *AlignCheck* kerasid (*AlignCheck*, Sony Biotechnology Inc.) ja (*8-peak Beads*, Sony Biotechnology Inc.). Laserite pinged on kajastatud tabelis 3. Pingeid muudeti paneeli kogumistel, sest algsete pingete kasutamisel olid signaalid liiga küllastunud. Küllastunud signaalide häirivad antikehade eristamist, muutes analüüsi vähem täpseks. Uutel pingetel fluorkroomide signaalide eraldamine oli parem.

**Tabel 3. Spektraalsevoolutsütomeetri laserite pinged, millel PBMCd koguti.** 4 eri laseri (405,488,561 ja 637 nm) PMT detektorite pinged, mida muudeti optimeerimise katsete faasides ja ka FSC ja SSC detektorite võimendused, mis jäid optimeerimisprotsessi vältel samaks.

FSC võimendus	17			
SSC võimendus	5.3			
Laser	405 nm	488 nm	561 nm	637 nm
PMT pinge - Optimeerimise ja tiitrimise faasides	5.5	5	5.6	5.9
PMT pinge - Paneeli kogumistel	5.2	5.2	5.0	5.0

PBMC-dega proovidest üritati koguda 200000 sündmust (*events*), millest üks sündmus peaks vastama ühele rakule, kui kasutati kompensatsioonikerasid, siis neid koguti 5000 sündmuse jagu. Kogutud andmete analüüs toimus kasutades ID7000 Software programmi (Sony). Rakkudel tehtud mõõtmised algasid kõik FSC-A (*forward scatter area*) ja SSC-A (*side scatter area*) alusel suurte rakupopulatsioonide eristamisega, millele järgnes huvipakkuva populatsioonile loodud raami (*gate*) alusel üksikrakkude (*singlet*) eraldamine, kasutades FSC-H (*forward scatter height*) ja FSC-A parameetreid, et vältida rakke, mis on kokku kleepunud. Joonisel 8 on näha kuidas toimus analüüsi esimene etapp. Peale seda jätkati katse fluoreseentsmärgisega markerite analüüsiga.

Kui kasutati kompensatsioonikerasid, siis pandi raam keradele FSC-A ja SSC-A alusel ning jätkati analüüsiga.



**Joonisel 8. Kujutatud kuidas toimus analüüsi esimene etapp.** A poolel on näha kuidas eraldati üks rakupopulatsioon kõikidest kogutud rakkudest. B osas on näha kuidas eraldatud rakupopulatsioonist leiti üksikrakud. Piltidel on kasutatud sama doonorit (N61) ja kogutud samal päeval ja pingetel, mis on omased optimeerimise ja tiitrimise faasidele.

## 2.2.10. Töös kasutatud tarkvarad

Kogutud andmeid visualiseeriti ja analüüsiti ID7000 Software programmis (Sony). Titreerimise analüüsil kasutati Microsoft Excel programmi (Microsoft). Autori poolt loodud jooniste tegemiseks kasutati BioRender ja Canva programme.

### 3. TULEMUSED JA ARUTELU

Töö eesmärgiks oli luua paneel, mis lubaks tuvastada mitmeid erinevaid T-rakkude populatsioone PBMC-des. Hea paneeli arendamine eeldab mitme sammu täitmist: peab välja valima antikehad, mida kasutada, otsustama värvinguaja üle, neid tiitrima enne kui saab paneeli kokku panna.

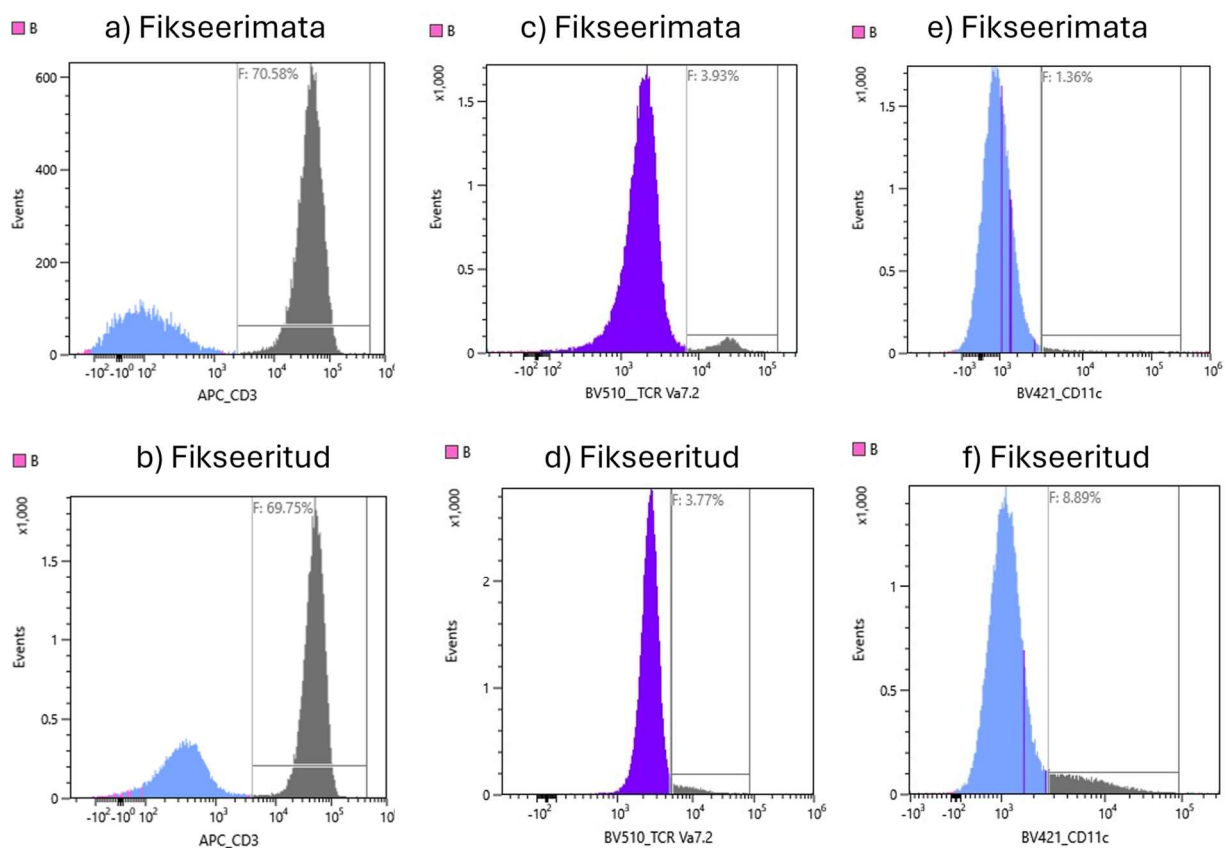
#### 3.1.1. Fikseeritud ja permeabiliseeritud *versus* fikseerimata antikehad

T-rakkude paneeli jaoks oli plaanis kasutada (Whyte *et al.*, 2022) artiklis tutvustatud antikehade värvingu protokoll. See hõlmab endast antikehade värvingu pikendamist ja optimaalsete tiitrite leidmist pikkadele värvingutele.

Esimeses katsete faasis sooviti leida antikehad, mis on võimelised seonduma fikseeritud ja permeabiliseeritud rakkudele, ning võrdlema neid tulemusi rakkudega, mis neid protsesse ei läbinud. Katseid tehti, kuna oli soov pikendada antikehade värvimise kestvust üleööni. Pikem aeg lubaks kasutada vähem antikehi nii, et mõõdetud tulemus ei erine katsest, kus on lühike inkubatsiooniaeg ja suur antikehade kontsentratsioon. Pika värvingu eeliseks on ka see, et antikehadel, millel on madalam afiinsus sihtmärgile, antakse rohkem aega seondumiseks (Whyte *et al.*, 2022). Värvingu aja pikendamine võib aga mõjuda negatiivselt rakkude elulemusele, sest rakud ei ole optimaalsetes tingimustes. Üks viis seda vältida, mida soovitati ka Whyte *et al.* artiklis, on rakud fikseerida. Fikseerides rakkude struktuur ja komponendid säilivad paremini, kuid selle käigus võivad osade retseptorite kujud muutuda nii, et antikeha seondumine on häiritud (Kruzick *et al.*, 2005).

Katsed viidi läbi nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.4. Selles faasis testitud antikehad on näha tabelis 4, kuhu on ka lisatud neile sobivad seondumised. Seondumiste hindamine toimus visuaalselt kasutades histogramme, kus vastandati antikehast pärinev signaal kogutud sündmuste arvuga. Võrdluste näiteks on joonis 9, kus on välja toodud kolme erineva antikeha seondumised. Seal on antikeha (CD3, APC, Joonis 9, a ja b), mille puhul fikseerimine ei mõjuta seondumist. Näha on ka antikeha, kus fikseerimine häirib seondumist (TCR V $\alpha$ 7.2, BV510, Joonis 9, c ja d) kui ka antikeha, kus fikseerimine parandab saadavat signaali (CD11c, BV421, Joonis 9, e ja f). Kui antikeha töötas hästi nii fikseerimata kui ka fikseeritud PBMC-del, eelistati kasutada seda fikseeritud rakkudel, sellest tuleb lähemalt juttu peatükis 3.1.2.

Katsete alguses, ainult ei fikseeritud vaid ka permeabiliseeriti rakke. Seda tehes on võimalik tuvastada markereid, mis olid mingil hetkel pinnal ekspresseeritud, kuid mis liiguvad raku sisemusse, lisaks lubab see ka tuvastada erinevaid raku siseseid valke ja retseptoreid (McKinnon, 2018). Permeabiliseerimine võib häirida pinnamarkerite seondumist, kuna selle käigus rakkude membraani tekitatakse auke, võivad seal asuvad valgud kaduma minna, samuti võib sellega kaasneda retseptorite kuju muutus, häirides omakorda seondumist (Dzangué-Tchoupou et al., 2018). Käesolevas töös sooviti rohkem keskenduda pinnamarkeritele, siis otsustati, et järgnevates katsetes permeabiliseerimise etapp vahele jätta, välja arvatud juhul kui töötati raku siseste markeritega.



**Joonis 9. Seondumiste võrdlus antikehade vahel.** Histogrammidel on kujutatud nelja erineva antikeha (CD3, TCRV $\alpha$ 7.2, CD11c ja FoxP3) seondumine nii fikseerimata või fikseeritud PBMCdele. CD3 puhul a) ja b) on näha, et seondub edukalt mõlemale rakutüübile, TCRV $\alpha$ 7.2 antikeha jaoks fikseerimata rakkudele c) on seondumine edukas, kuid fikseeritud ja d) seondumist ei toimu. CD11c puhul on näha d), et fikseeritud PBMC-del töötab paremini kui fikseerimata PBMC-del e Kõik proovid on tehtud samal doonoril (N61) sama antikehade kontsentratsiooniga.

**Tabel 4. Antikehad, millel määrati ära, kas sidumine toimus paremini fikseeritud või fikseerimata PBMCdel. Tärniga (\*) on märgitud rakusisesed markerid. Antikehad millega katseid jätkati on märgitud tumedalt.**

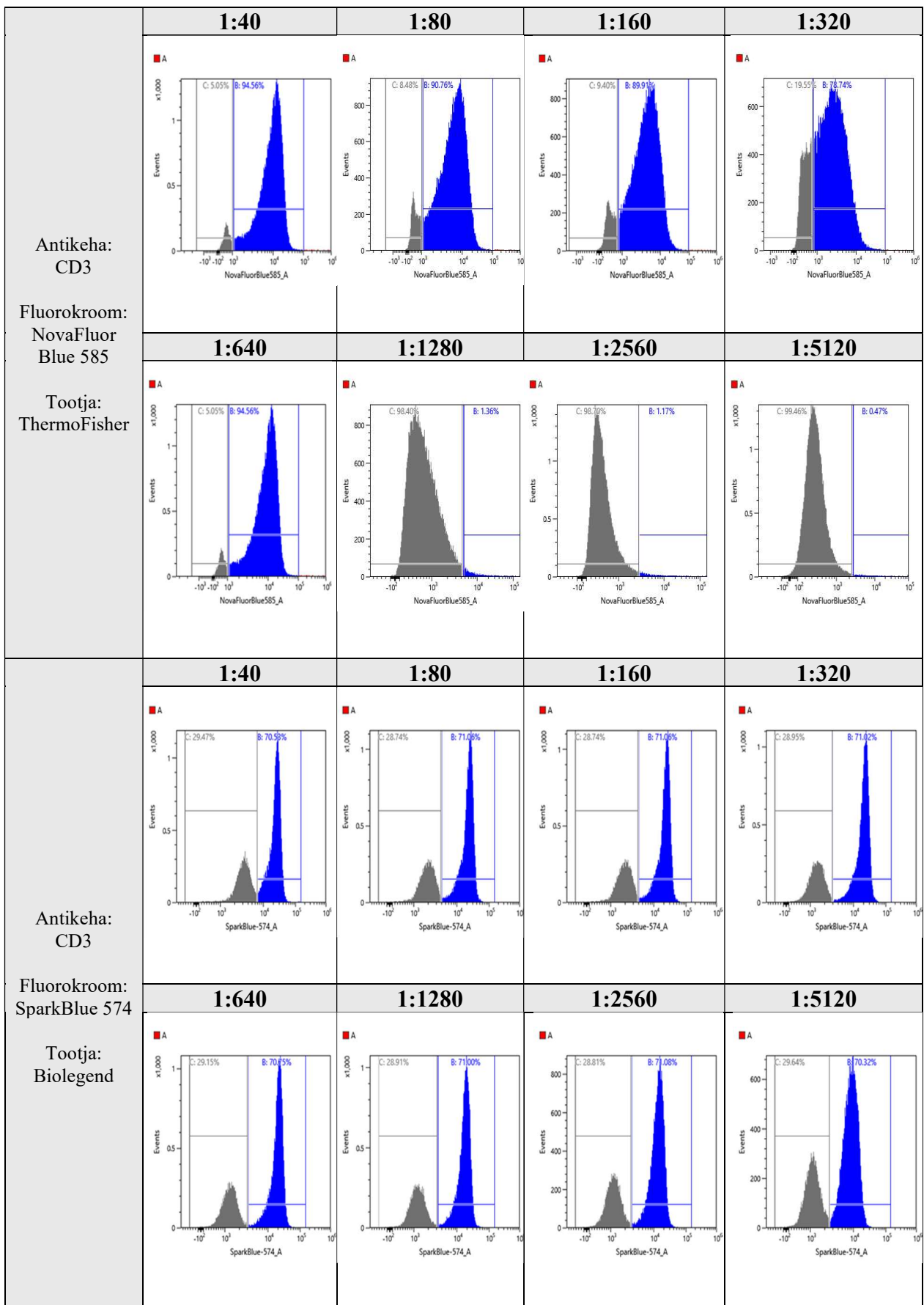
	<b>Antikeha</b>	<b>Kloon</b>	<b>Fluorokroom</b>	<b>Fikseeritud</b>	<b>Fikseerimata</b>
1	<b>CCR7</b>	<b>G043H7</b>	<b>APC/Fire 750</b>		+
2	<b>CD11b</b>	<b>ICRF44</b>	<b>NovaFluor Yellow 590</b>	+	+
3	<b>CD11c</b>	<b>3.9</b>	<b>Brilliant Violet 421</b>	+	
4	<b>CD123</b>	<b>6H6</b>	<b>SuperBright 436</b>	+	+
5	CD127	CD28.2	PE-Cy5	+	+
6	<b>CD127</b>	<b>eBioRDR5</b>	<b>NovaFluor Yellow 610</b>	+	
7	<b>CD127</b>	<b>A019D5</b>	<b>Brilliant Violet 510</b>		+
8	<b>CD14</b>	<b>61D3</b>	<b>Alexa Fluor 532</b>	+	
9	<b>CD15</b>	<b>HI98</b>	<b>SparkViolet 423</b>	+	
10	<b>CD16</b>	<b>eBioCB16</b>	<b>NovaFluor Yellow 730</b>	+	+
11	<b>CD16</b>	<b>3G8</b>	<b>SparkBlue 515</b>		+
12	CD161	HP-3G10	Alexa Fluor 647	+	+
13	<b>CD161</b>	<b>HP-3G10</b>	<b>Pacific Blue</b>	+	
14	CD19	HIB19	APC	+	+
15	CD19	HIB19	BB515		+
16	<b>CD19</b>	<b>HIB19</b>	<b>NovaFluor Blue 510</b>		+
17	<b>CD20</b>	<b>2H7</b>	<b>FITC</b>	+	+
18	<b>CD21</b>	<b>Bu32</b>	<b>APC</b>	+	+
19	CD24	SN3	PE-Alexa Fluor 610		+
20	<b>CD24</b>	<b>SN3</b>	<b>StarBright Blue 700</b>	+	
21	<b>CD25</b>	<b>M-A251</b>	<b>PE/Fire 640</b>		+
22	CD27	A019D5	APC	+	+
23	<b>CD27</b>	<b>O323</b>	<b>NovaFluor Red 725</b>		+
24	<b>CD27</b>	<b>O323</b>	<b>Alexa Fluor 700</b>		+
25	CD3	SK7	APC	+	+
26	CD3	OKT	APC	+	+
27	<b>CD3</b>	<b>OKT3</b>	<b>NovaFluor Blue 585</b>	+	+
28	<b>CD3</b>	<b>UCHT1</b>	<b>SparkBlue 574</b>	+	
29	<b>CD3</b>	<b>UCHT1</b>	<b>StarBrightBlue 765</b>	+	+
30	CD307d	413D12	PE	+	+
31	<b>CD33</b>	<b>WM53</b>	<b>NovaFluor Yellow 660</b>	+	
32	<b>CD33</b>	<b>P67.6</b>	<b>SparkYG 581</b>	+	
33	<b>CD38</b>	<b>HB-7</b>	<b>APC/Fire™ 810</b>	+	+
34	<b>CD39</b>	<b>eBioA1</b>	<b>NovaFluor Yellow 755</b>	+	
35	<b>CD4</b>	<b>SK3</b>	<b>SparkBlue 550</b>	+	+
36	CD45RA	HI100	PE-Cy7	+	+
37	<b>CD45RA</b>	<b>HI100</b>	<b>Brilliant Violet 570</b>	+	
38	<b>CD56</b>	<b>HCD56</b>	<b>Brilliant Violet 650</b>	+	+
39	<b>CD57</b>	<b>QA17A04</b>	<b>Brilliant Violet 785</b>	+	+
40	CD8a	RPA-T8	Brilliant Violet 605	+	+
41	<b>CD8a</b>	<b>OKT8</b>	<b>NovaFluor Blue 610</b>		+
42	<b>CD8</b>	<b>LT8</b>	<b>StarBright Blue 810</b>	+	+
43	<b>CD8</b>	<b>LT8</b>	<b>StarBright Blue 615</b>		+

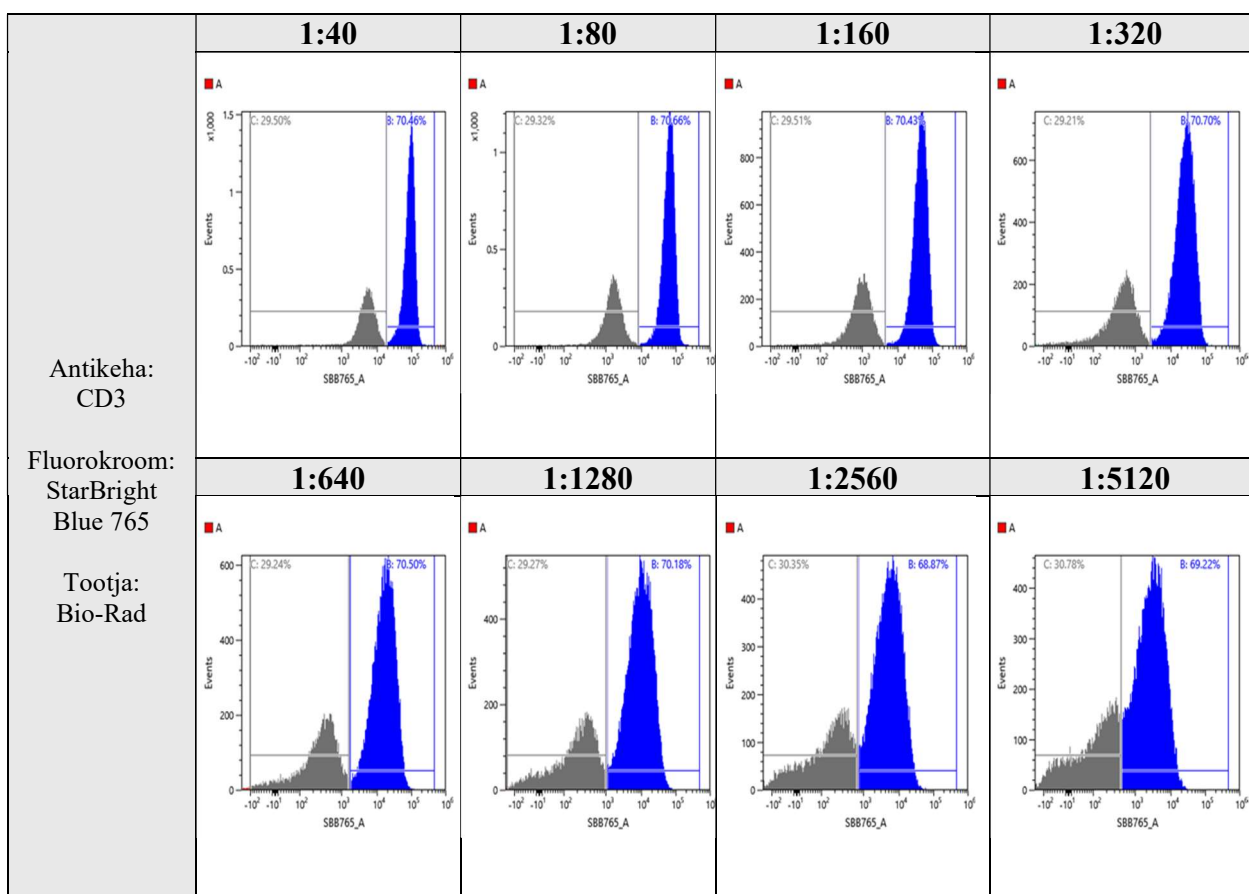
44	CXCR3	G025H7	APC	+	+
45	<b>CXCR3</b>	<b>G025H7</b>	<b>PE-Fire 810</b>		+
46	CXCR5	J252D4	Brilliant Violet 421	+	+
47	<b>CXCR5</b>	<b>J252D4</b>	<b>Brilliant Violet 750</b>	+	+
48	<b>EOMES*</b>	<b>WD1928</b>	<b>Alexa Fluor 660</b>	+	
49	FOXP3*	259D	Alexa Fluor 488	+	
50	<b>FOXP3*</b>	<b>206D</b>	<b>SparkNIR 685</b>	+	
51	HELIOS*	22F6	Spark YG 581	+	
52	<b>HELIOS*</b>	<b>22F6</b>	<b>PE</b>	+	
53	HLA-DR	L243	Brilliant Violet 510		+
54	<b>HLA-DR</b>	<b>LN3</b>	<b>NovaFluor Blue 660</b>	+	
55	<b>ICOS</b>	<b>ISA-3</b>	<b>NovaFluor Yellow 700</b>	+	
56	<b>ICOS</b>	<b>397.4A</b>	<b>PE-Cy5</b>	+	+
57	<b>ICOS</b>	<b>ISA-3</b>	<b>PE-Cy5.5</b>	+	+
58	IgD	IA6-2	PE	+	+
59	<b>IgD</b>	<b>IA6-2</b>	<b>Brilliant Violet 480</b>	+	+
60	<b>IgM</b>	<b>MHM-88</b>	<b>Pe-Cy7</b>	+	+
61	<b>Ki-67*</b>	<b>20Raj1</b>	<b>PE-eFluor 610</b>	+	
62	<b>PD1</b>	<b>EH12.2H7</b>	<b>Brilliant Violet 711</b>		+
63	<b>T-bet*</b>	<b>4B10</b>	<b>Brilliant Violet 605</b>	+	
64	<b>TCR Va24-Ja18</b>	<b>6B11</b>	<b>Brilliant Violet 510</b>	+	
65	TCR Va7.2	3C10	Brilliant Violet 510		+
66	TCR Va7.2	HP-3G10	Pacific Blue	+	+
67	<b>TCR Va7.2</b>	<b>3C10</b>	<b>AlexaFluor 647</b>	+	
68	<b>TCR <math>\gamma\delta</math></b>	<b>B1.1</b>	<b>PerCP-eFluor 710</b>		+

### 3.1.2. Antikehadele optimaalse tiitri leidmine

Tiitrimine on oluline samm voolutsütomeetria paneelide arendamise juures. Nende katsete tegemine võimaldab leida madalaima kontsentratsiooni, kus antikehalt pärinev signaal on selgesti eristatav. Kui kasutada liiga palju antikeha võib tekkida mittespetsiifiline seondumine, mille tõttu muutuvad analüüsil rakupopulatsioonid raskesti eristatavaks. Liiga väikese kontsentratsiooni puhul saadakse rakupopulatsiooni kindlaks tuvastamiseks liiga nõrk signaal. Hea tiitri leidmine aitab seega parandada rakupopulatsioonide eristamist ja aitab vältida antikehade kulutamist, omades endas ka teatud majanduslikku kasu (Hulspas *et al.*, 2009).

Tiitrimine viidi läbi nagu kirjeldatud peatükis 2.2.6. Joonisel 10 on näidetena kujutatud tulemused, mis saadi peale proovide mõõtmist spektraal voolutsütomeetriga.





**Joonis 10. Kolme erineva CD3 antikeha tiitrimise tulemused fikseeritud PBMCdelmõõdetuna sony ID7000 spektraalvoolutsütomeetriga.. Tulemused on kajastatud histogrammil, kuhu raamid on pandud manuaalselt autori poolt. Mõõtmised CD3 (Novafluor Blue 585, Thermofisher) on sooritatud doonoril N56, CD3 (SparkBlue 574, Biolegend) ja CD3 (StarBrightBlue765, Bio-Rad) doonori N61 rakkudel.**

Antikehale parima kontsentratsiooni leidmine hõlmas endas visuaalset analüüsi ja arvutusi. Üks arvutusmeetod, mida kasutatakse tiitrite määramisel, põhineb fluorokroomi värvimisindeksi (*staining index*, SI) leidmisel. SI populariseeriti Maecker *et al.*, 2004 töös ja sellega saab määrata fluorokroomi heledust. Tiitrimiste kontekstis saab selle abil leida, kontsentratsiooni, kus signaal on eristatav ja taust minimaalne.

SI leiti kasutades järgnevat valemit:

$$\text{Staining index (SI)} = \frac{\text{MFI}(\text{positiivsest raamist}) - \text{MFI}(\text{negatiivsest raamist})}{2 * \text{SD}(\text{negatiivsest raamist})}$$

Arvutused hõlmasid positiivse raami fluoretsentsi intensiivuse keskmise (*mean fluorescence index*, MFI) lahutamist negatiivse raami MFI-st ning selle jagamise 2 kordse standardhälbega (*standard deviation*, SD) negatiivsest raamist. Saadud SI pannakse graafikusse ja võetakse kolm kõige kõrgemat tulemust, millest parim valitakse visuaalsel analüüsil. Tulemuste näitena on tabelis 5 toodud arvutused koos SI tulemustega.

**Tabel 5. Kolme erineva CD3 Spektraalse indeksi (SI) arvutused.** Saadud tulemused on kujutatud graafiku vormis. Tumedalt on märgitud SI tulbas kolm kõige kõrgemat SI väärtust ning graafikul on nende ümber pandud mustad jooned.

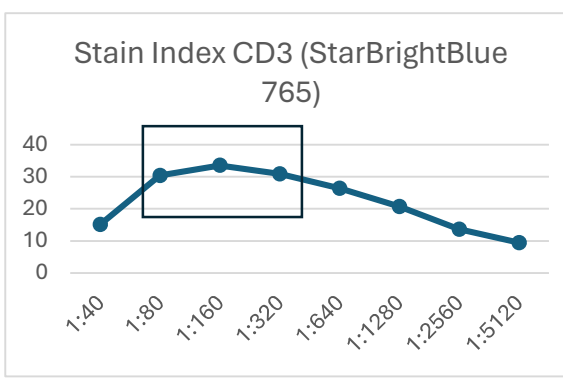
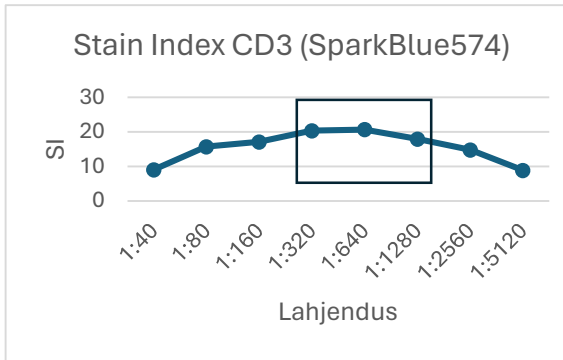
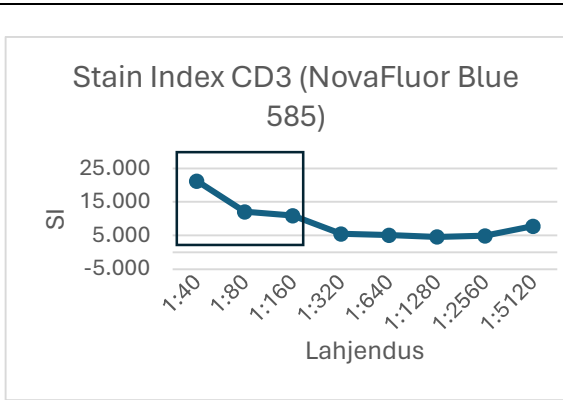
<b>CD3 Novafluor Blue 585</b>				
	<b>Pos Med</b>	<b>Neg Med</b>	<b>SD neg</b>	<b>SI</b>
1:40	9922.42	582.05	219.61	<b>21.27</b>
1:80	6257.11	517.59	236.76	<b>12.12</b>
1:160	4170.13	425.99	170.76	<b>10.96</b>
1:320	2417.09	454.62	177.13	5.54
1:640	1846.1	311.16	148.38	5.17
1:1280	6703.87	649.13	654.99	4.62
1:2560	3752.99	420.39	334.57	4.98
1:5120	4126.62	347.29	242.1	7.81

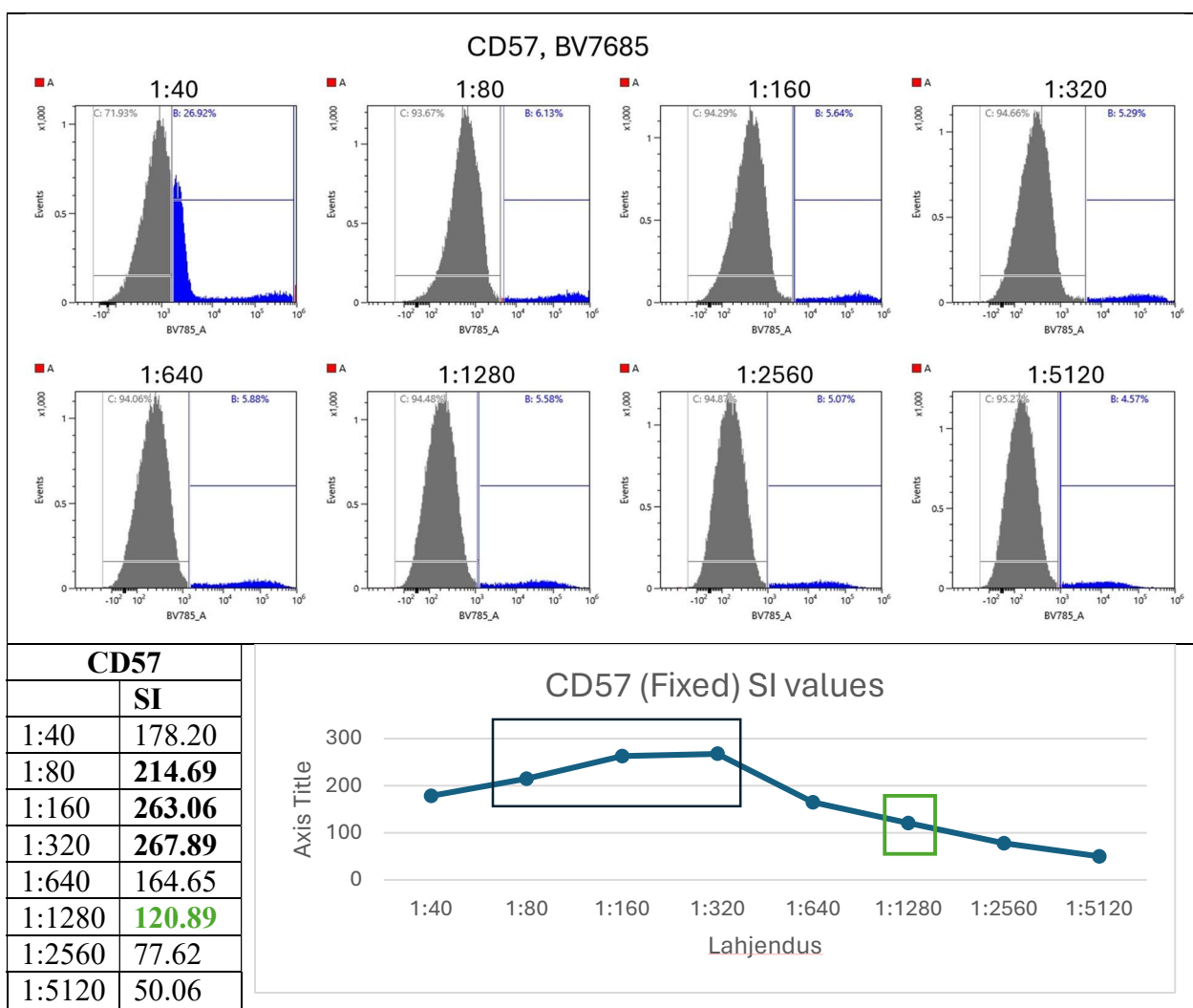
<b>CD3 Spark Blue 574</b>				
	<b>Pos Med</b>	<b>Neg Med</b>	<b>SD neg</b>	<b>SI</b>
1:40	24610.87	3195.51	1177.33	9.09
1:80	22988.92	1962.67	668.99	15.76
1:160	22061.06	1591.9	596.7	17.15
1:320	21256.97	1394.41	488.82	<b>20.32</b>
1:640	20405.88	1281.85	461.48	<b>20.72</b>
1:1280	17852.91	1204.95	463.81	<b>17.95</b>
1:2560	13749.02	1151.37	424.47	14.84
1:5120	8642	1125.97	423.4	8.88

<b>CD3 StarBright Blue 765</b>				
	<b>Pos Med</b>	<b>Neg Med</b>	<b>SD neg</b>	<b>SI</b>
1:40	93678.98	5254.66	2929.17	15.09
1:80	64790.59	1606.63	1041.41	<b>30.34</b>
1:160	46738.58	953.28	682.18	<b>33.56</b>
1:320	26743.16	478.52	425.25	<b>30.88</b>
1:640	16680.94	323.23	309.46	26.43
1:1280	9575.93	215.02	225.67	20.74
1:2560	5216.96	163.45	185.84	13.60
1:5120	2788.51	124.79	140.4	9.47



Selline optimaalse kontsentratsiooni leidmine töötab, kui signaal on tugev ja positiivne/negatiivne populatsioon eristuvad kergesti, nagu oli tabelis 5 näha CD3 (SparkBlue 574) ja CD3 (StarBrightBlue 765) puhul. Juhul kui positiivsed ja negatiivsed populatsioonid olid raskesti eristatavad ei olnud SI määramisel parima kontsentratsiooni leidmisel abi, sest arvutuses kasutatav info sõltub kui hea on raamide asetus. Seda illustreerib hästi joonis 11, kus on kujutatud antikeha CD57 lahendusrida ja arvutatud SI põhjal graafik. Selliste antikehade puhul tehti otsus visuaalsete tulemuste põhjal. Tabelis 6 on kajastatud tiitrimiste tulemustel leitud antikehade optimaalsed kontsentratsioonid.



**Joonis 11. CD57 (BV785, BioLegend) lahendusrea tulemused ja SI tulemuste põhjal loodud graafik, SI järgi on parim kontsentratsioon vahemikus 1:80-1:320 ning graafikil on need väärtused märgitud musta kastiga. Visuaalselt vaadates, fluorokroomi eraldus on hea kuni kontsentratsioonini 1:2560. Roheliselt on tabelis ja graafikil välja toodud visuaalsete tulemuste järgi otsustatud parim tiiter (1:1280). Mõõtmised on sooritatud N61 PMBC-dega.**

Tiitrimise faas oli ka see, kus hakati rakendama üleöö kestvat värvingut. Saadud tulemused vastasid ootustele, sest oli näha, et fikseeritud rakkudele mõeldud antikehade tiitrid jäid vahemikku 1:320-1:2560. Samal ajal kui fikseerimata rakkude antikehade kontsentratsioonide vahemikud olid suuremad 1:40-1:1280.

**Tabel 6. Antikehad, millele leiti optimaalne tiiter.**

Nr	Antikeha	Kloon	Fluorokroom	Optimaalne tiiter	Fikseeritud või Fikseerimata
1	CCR7	G043H7	APC/Fire 750	1:640	Fikseerimata
2	CD127	A019D5	Brilliant Violet 510	1:160	Fikseerimata
3	CD19	HIB19	NovaFluor Blue 510	1:1280	Fikseerimata
4	CD25	M-A251	PE/Fire 640	1:320	Fikseerimata
5	CD27	O323	NovaFluor Red 725	1:320	Fikseerimata
6	CD27	O323	Alexa Fluor 700	1:1280	Fikseerimata
7	CD38	HB-7	APC/Fire™ 810	1:160	Fikseerimata
8	CD8a	OKT8	NovaFluor Blue 610	1:80	Fikseerimata
9	CD8	LT8	StarBright Blue 615	1:160	Fikseerimata
10	CXCR3	G025H7	PE-Fire 810	1:40	Fikseerimata
11	CXCR5	J252D4	Brilliant Violet 750	1:160	Fikseerimata
12	HLA-DR	LN3	NovaFluor Blue 660	1:320	Fikseerimata
13	ICOS	ISA-3	NovaFluor Yellow 700	1:80	Fikseerimata
14	IgD	IA6-2	Brilliant Violet 480	1:1280	Fikseerimata
15	PD1	EH12.2H7	Brilliant Violet 711	1:80	Fikseerimata
16	TCR Va7.2	3C10	Alexa Fluor 647	1:1280	Fikseerimata
17	TCR γδ	B1.1	PerCP-eFluor 710	1:80	Fikseerimata
1	CD11b	ICRF44	NovaFluor Yellow 590	1:320	Fikseeritud
2	CD11c	3.9	Brilliant Violet 421	1:1280	Fikseeritud
3	CD123	6H6	SuperBright 436	1:640	Fikseeritud
4	CD127	eBioRDR5	NovaFluor Yellow 610	1:320	Fikseeritud
5	CD14	61D3	Alexa Fluor 532	1:320	Fikseeritud
6	CD15	HI98	SparkViolet 423	1:640	Fikseeritud
7	CD16	eBioCB16	NovaFluor Yellow 730	1:1280	Fikseeritud
8	CD16	3G8	SparkBlue 515	1:1280	Fikseeritud
9	CD161	HP-3G10	Pacific Blue	1:1280	Fikseeritud
10	CD20	2H7	FITC	1:1280	Fikseeritud
11	CD21	Bu32	APC	1:1280	Fikseeritud
12	CD24	SN3	StarBright Blue 700	1:640	Fikseeritud
13	CD3	OKT3	NovaFluor Blue 585	1:160	Fikseeritud
14	CD3	UCHT1	SparkBlue 574	1:1280	Fikseeritud
15	CD3	UCHT1	StarBrightBlue 765	1:320	Fikseeritud
16	CD33	WM53	NovaFluor Yellow 660	1:320	Fikseeritud
17	CD33	P67.6	SparkYG 581	1:1280	Fikseeritud
18	CD39	eBioA1	NovaFluor Yellow 755	1:640	Fikseeritud
19	CD4	SK3	SparkBlue 550	1:640	Fikseeritud
20	CD45RA	HI100	Brilliant Violet 570	1:320	Fikseeritud

21	CD56	HCD56	Brilliant Violet 650	1:160	Fikseeritud
22	CD57	QA17A04	Brilliant Violet 785	1:1280	Fikseeritud
23	CD8	LT8	StarBright Blue 810	1:640	Fikseeritud
24	ICOS	397.4A	PE-Cy5	1:320	Fikseeritud
25	ICOS	ISA-3	PE-Cy5.5	1:320	Fikseeritud
26	IgM	MHM-88	Pe-Cy7	1:2560	Fikseeritud
27	TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18	6B11	BV510	1:2560	Fikseeritud
1	EOMES	WD1928	Alexa Fluor 660	1:2560	Sisemine marker
2	FOXP3	206D	SparkNIR 685	1:1280	Sisemine marker
3	HELIOS	22F6	PE	1:1280	Sisemine marker
4	Ki-67	20Raj1	PE-eFluor 610	1:1280	Sisemine marker
5	T-bet	4B10	Brilliant Violet 605	1:320	Sisemine marker

Paneeli oli idee kaasata ThermoFisheri uusi NovaFluoridega konjugeeritud antikehi, millel on väike kiirguse vahemik. Need võimaldaks ühele laserile lisada mitmeid fluorokroome ja seeläbi suurendada kasutatavate antikehade arvu. Novafluorid kasutavad oma põhjana DNA polümeeri, kuhu on lisatud fluoreseeruvad värvimolekulid (*NovaFluor Dyes for High-Dimensional Panel Design*, n.d.).

Neid antikehi testides nägime probleemi - esines väga palju taustmüra. Põhjuseks on tõenäoliselt see, et värvid kleepusid rakkudele mittespetsiifiliselt. Tootja poolt oli antud soovitus, kasutada CellBlox™ (Invitrogen) blokeerimispuhvrit, kuid hoolimata selle lisamisest signaalid ei paranenud. Selle tõttu otsustastati, võimalikult palju NovaFluore oma paneelist välja jätta ja pidi leidma nendele antikehadele asendused, millega korrati eelnevalt mainitud katseid. Pinnamarkerite paneeli jäi sisse vaid HLA-DR konjugeeritud NovaFluor Blue 660-ga, nagu näha tabelis 1.

### 3.1.3. Paneeli disain ja tulemused

Nagu eelnevalt mainitud, lubab spektraalse voolutsütomeetri kasutamine luua paneele, mis koosnevad paljudest antikehadest. Paneeli disain on selle võrra raskem. Siin töös sooviti luua paneel, mis keskenduks erinevatele T-rakkude populatsioonidele.

Antikehade kasutamisel peab arvestama nii kloonid kui ka konjugeeritud fluorokroomi omadustega. Eri kloonid võivad tunda ära sihtmärgi eri epitoope ja sellest tuleneb nende seondumis afiinsuste erinevus. Haruldastele markeritele on vaja leida tugevalt siduvad kloonid ning võimalikult heledad fluorokroomid (Saper, 2009). Spektraalne voolutsütomeeter on küll väga hea fluorokroomide signaalide eristamises, kuid siiski võib analüüsil esineda probleeme, kui kasutada väga sarnase

kiirgumisspektriga fluorokroome, nagu on BV605 ja BV650 sarnaste rakupopulatsioonide eristamiseks (Ferrer-Font et al., 2021). Fluorokroomide valikul mängib rolli ka masin. Siin töös kasutatav spektraalne voolutsütomeeter on 4 laseriga, seega saab valida vaid antikehi, mille maksimaalne eksitatsioonispekter jääb ühe nende mõõdetava lainepikkuse alla. Selle kõige piiravaks faktoriks on kommertsiaalselt kättesaadavate antikehade arv. Need asjaolud määravad ära, milliseid antikehi saab paneelis kasutada.

Paneeli analüüsimiseks on enne vaja luua spektraalne referentsiraamatukogu (kirjeldatud peatükis 2.2.8). Raamatukokku salvestatud signaalide referentsid säilivad ehk mõõtmisi nende jaoks ei pea kordama, neid saab rakendada järgmistele proovidele, milleks võivad olla teised doonorid või ka paneelid. Siin töös kasutati fluorokroomide signaale, mis pärinesid kompensatsioonikeradelt, kuid kasutada võib ka rakke. Mõlemal raamatukogu ehitamise viisil on oma eelised ja puudused. Üks kompensatsioonikerade eelis rakkude ees on see, kui soovitakse mõõta sellise fluorokroomi signaali, mis on seondub väikesele rakupopulatsioonile nagu  $\gamma\delta$  TCR T-rakud. Kompensatsioonikeradest, piisab väikesest sündmuste hulgast, et saada selget signaali raamatukogu jaoks, samas kui rakke peaks koguma mitusada tuhat. Kompensatsioonikerad ei peegelda alati päriselu, sest seondumine on rakkudest erinev. Rakkude kasutamise eelis raamatukogu loomiseks on see, et saadud signaalid on proovidelt saadavate signaalidega paremini võrreldavad, omades ka sarnast autofluoretsentsi (den Braanker et al., 2021; Shevchenko et al., 2023).

Planeerimis faasis oli soov kasutada samaaegselt rakupinna ja rakusiseseid markereid, mis võimaldaks suurendada tuvastatavate populatsioonide arvu. Selline paneel disainiti ja katsetati (Lisa 2). Saadud tulemuste põhjal polnud analüüsi võimalik sooritada, sest signaalid ei eristunud rakupopulatsioonide vahel. Arvatavasti oli muutus tingitud permeabiliseerimispuhvrist, sest kui eelnevalt rakke permeabiliseeriti, nagu kirjeldatud peatükis 2.2.4, tehti seda enne antikehade lisamist, ning inkubatsiooniaeg oli lühem. Paneelis ei saa rakke eelnevalt permeabiliseerida, sest kasutusel on markerid, mis seonduvad vaid fikseerimata rakkudele. Sellest tingituna võeti vastu otsus kasutada töös kahte paneeli: üks pinnamarkeritele ja teine raku sees leiduvatele markeritele.

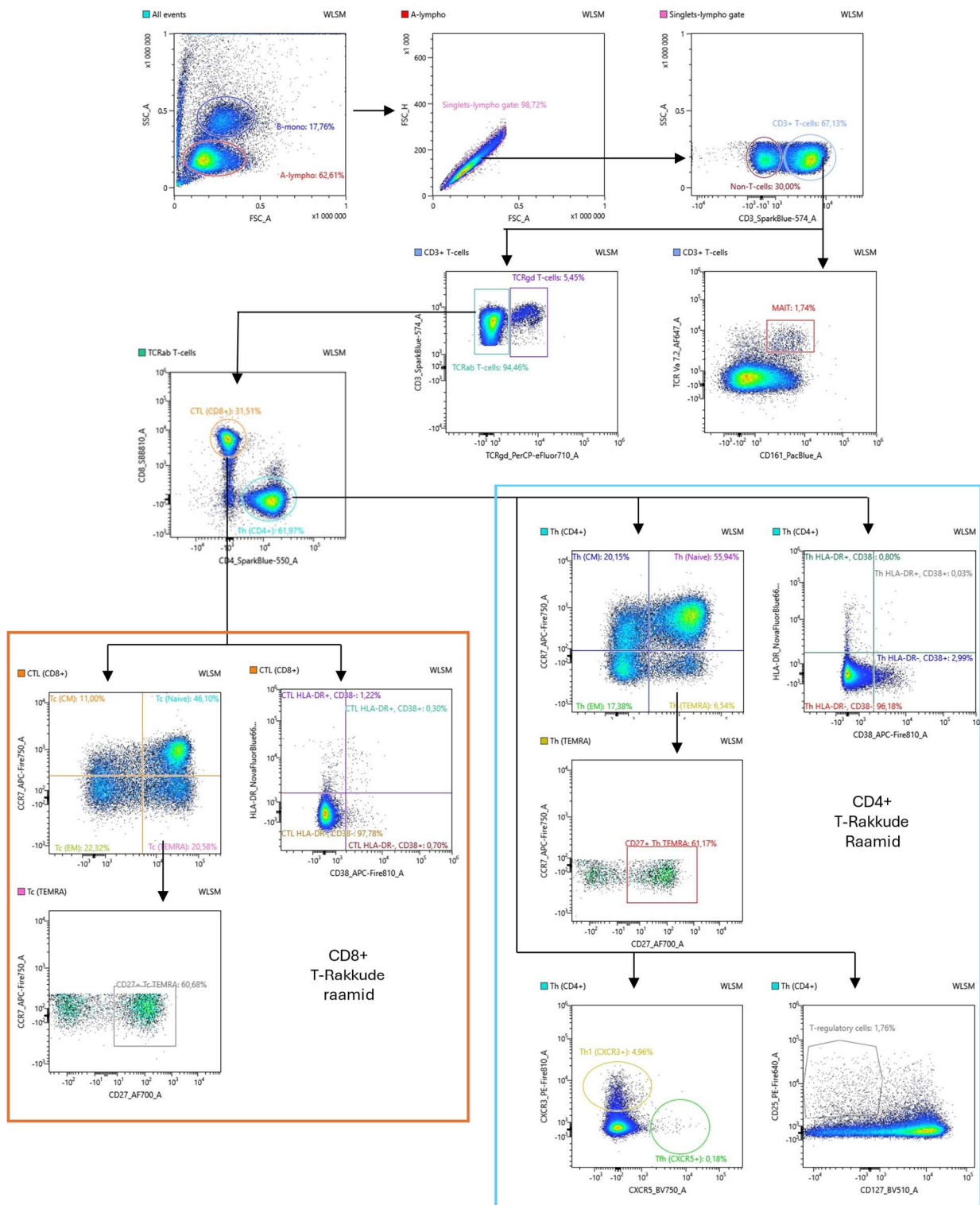
Pinnamarkerite paneelil oli eelnev versioon, milles kasutatud antikehad ja analüüsi tulemused on leitavad lisa 2. Kuigi analüüsil oli võimalik mingeid rakupopulatsioone leida, esines siin signaalide eristamises ikkagi probleeme. Vigade allikaks on häirinud „*unmixing*“ toimumine. Selle välitsemiseks loodi uus raamatukogu nagu kirjeldatud peatükis 2.2.8. Uut spektraalset raamatukogu

rakendati järgmisel paneelil (tabel 1, joonis 12) ning sellega T-rakkude eristamises probleeme ei esinenud.

Paneelid, mida töös kasutati ja antikehad, mida nendes kasutati, on kirjeldatud metoodika osas, peatükis 2.2.7. Nende tulemuste analüüsil oli näha selgesti eristuvaid rakupopulatsioone. Voolutsütomeetria analüüs hõlmab endas raamide (*gate*) asetamist, et eristada populatsioone üksteisest. Paremaks eraldamiseks on kasulik paneeli lisada ka markereid, mis on omased teistele lümfotsüütide raamis olevatele rakkudele, nagu näiteks B-rakud ja NK-rakud (loomulikud tapjarakud, *natural killer cells*) ja DC (dendriittrakud, *dendritic cells*).

Esimene raam pannakse paika rakkude suuruse ja granulaarsuse järgi. Monotsüütide eraldamine lümfotsüütidest on lihtne, sest nad on suuremad ja granulaarsemad seetõttu eristuvad hästi FSC ja SSC kanalis. Selle abil saab ka vähendada surnud rakkude ja rakupudi (*cellular debris*) osakaalu analüüsil, sest neil on nõrk FSC signaal. Lümfotsüütide ja NK-rakkude raami analüüsi järgmiseks sammuks oli üksikrakkude eraldamine. Rakud, mis on agregeerinud omavad üksikrakkudest tugevamat FSC-A ja FSC-H signaali. Selle sammuga saab vältida rakuagregaatide kaasamist analüüsi, mis võib populatsioonide eristamist raskendada. Näiteks kui on soov B-rakke eristada T-rakkudest võib agregaat omada markereid omaseid mõlemale populatsioonile. Need sammud on ühtsed paljude teiste paneelidega, mille on loonud näiteks Edwards et al., 2023 spektraalsele voolutsütomeetrile ja Liechti & Roederer, 2019 konventsionaalsele tsütomeetrile.

Järgnevad analüüsisammud on töös loodud paneelide spetsiifilised, sest kasutavad fluorokroomide signaalide järgi raamimist. Joonisel 12 on pinnamarkerite paneeli raamid. Pinnamarkerite paneeliga on võimalik ühest proovist eristada 30 T-rakkude populatsiooni, mis on kujutatud tabelis 7. Kõikide pinnamarkeritega eitavad populatsioonid on välja toodud lisa 3.



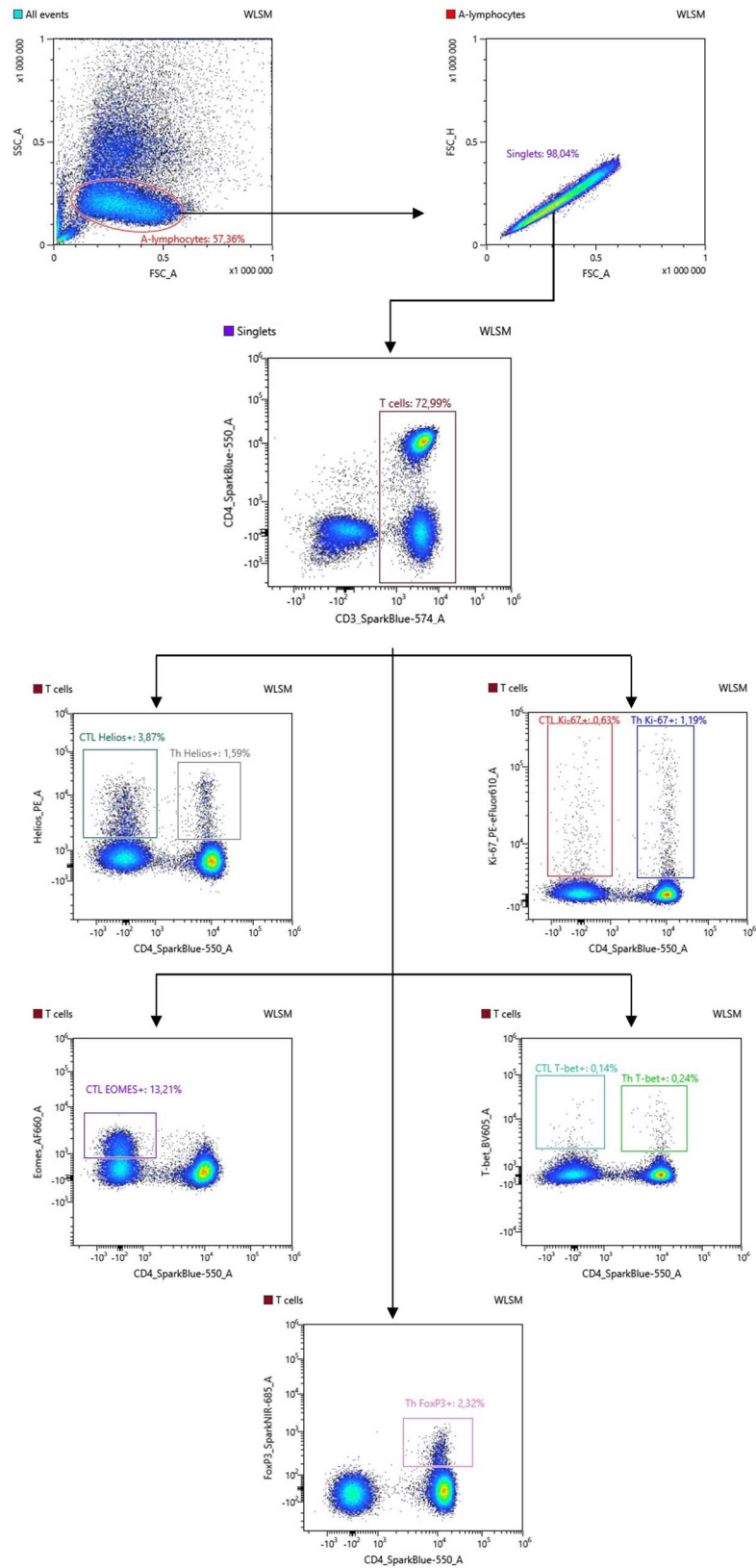
**Joonis 12. Pinnamarkerite paneeli põhjal loodud raamide strategia erinevate T-rakkude populatsioonide tuvastamiseks.** Lümfotsüütide ja NK-rakkude raamist eristatakse T-rakud, vaadates nende CD3 ekspressiooni. T-rakkude raami kasutades leitakse MAIT-rakud, sest neil on kõrge CD161 ja TCR Va7.2 tase. T-rakkude raami põhjal eristatakse  $\alpha\beta$  TCR-ga T-rakke haruldasematest  $\gamma\delta$  TCR T-rakkudest.  $\alpha\beta$ -Rakkudest määrati ära suured T-rakkude alatüübid, nimelt Th (CD4+) ja CTL (CD8+). Mõlemal populatsioonil leiti CD45RA ja CCR7 ekspressiooni

põhjal naiivsed rakud ning erinevad mälorakkude alatüübid (CM, EM ja TEMRA). Veel uuriti TEMRA-de diferentseerumise astet CD27 olemasolu baasil. Th ja CTL populatsioonidelt määrati ära ka nende aktvatsioonistaatus, leides kas toimub HLA-DR ja CD38 ekspressioon või mitte. Th rakkude hulgast otsiti ka üles reguleeritud T-rakud, kasutades CD127 ja CD25 antikehasid. Vaadati ka Th CXCR3 ja CXCR5 ekspressiooni, millega sai ära tuvastada Th1 ja Tfh alapopulatsioonid. Paneelis kasutatud PBMC kuuluvad doonorile N32.

**Tabel 7. T-raku populatsioonid, mis on leitavad kasutades pinnamarkerite paneeli**

Marker(id)	Populatsioon
CD3+	T-rakud
CD3+, TCR $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ T-rakud
CD3+, TCR $\gamma\delta$ -	$\alpha\beta$ T-rakud
CD3+, CD161+, TCRV $\alpha$ 7.2	MAIT-rakud
CD3+, CD4-, CD8+	CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7+, CD45RA+	Naiivsed CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA+	CTL TEMRA rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA+, CD27+	Pre-efektor CTL TEMRA rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA+, CD27-	Efektor CTL TEMRA rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA-	Efektor mälu CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7+, CD45RA-	Tsentraalsed mälu CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR+, CD38-	Aktiveerunud CTL rakud, APC omadustega
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR+, CD38+	Aktiveeritud CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR-, CD38+	Naiivsed või aktiveeritud CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR-, CD38-	Mitte-aktiveeritud CTL rakud
CD3+, CD4+, CD8-	Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7+, CD45RA+	Naiivsed Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA+	Th TEMRA rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA+, CD27+	Pre-efektor Th TEMRA rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA+, CD27-	Efektor Th TEMRA rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA-	Efektor mälu Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7+, CD45RA-	Tsentraalsed mälu Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR+, CD38-	Aktiveerunud Th rakud, APC omadustega
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR+, CD38+	Aktiveeritud Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR-, CD38+	Naiivsed või aktiveeritud Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR-, CD38-	Mitte-aktiveeritud Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CD25+, CD127 <sup>low</sup>	Treg
CD3+, CD4+, CD8-, CXCR3+	Th1 rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CXCR5+	Tfh rakud

Joonisel 13 on sisemarkerite paneel. Sisemarkerite paneeliga saab eristada 11 T-rakkude populatsiooni, mis on toodud välja tabelis 8. Nende seas ka Helios ekspresseerivad CTL, mida on varasemalt kirjeldatud, kuid selle olulisus inimestes on teadmata (Blom et al., 2015).



**Joonis 13. Rakusistemarkerite paneeli põhjal loodud raamide strateegia erinevate T-rakkude populatsioonide tuvastamiseks. Sisemarkerite paneelis peale CD3 abil T-rakkude leidmist hakati kohe vaatama sisemiste markerite ekspressiooni samaaegselt CD4-ga. See**

võimaldas kiirelt tuvastada kas marker on leitav Th, CTL või mõlemal populatsioonil. Ki-67 eristati mõlema alatüübi aktiveeritud ja jagunevad rakud. Ka Helios oli leitav CTL ja Th populatsioonidel.. Th alatüüpidest sai FoxP3+ kasutades leida Treg populatsiooni. Transkriptsioonifaktor T-bet on olemas nii Th1 kui ka aktiveeritud CTL hulgas. Paneelis kasutati doonori N32 rakke.

**Tabel 8. Sisemarkerite paneeliga leitavad T-rakkude populatsioonid**

Marker(id)	Populatsioon
CD3+	T-rakud
CD3+, CD4+, CD8-	Th-rakud
CD3+, CD4+, CD8-, FoxP3+	Treg
CD3+, CD4+, CD8-, T-bet+	Th1-rakud
CD3+, CD4+, CD8-, Helios+	Treg
CD3+, CD4-, CD8+, Ki-67+	Jagunevad Th-rakud
CD3+, CD4-, CD8+	CTL-rakud
CD3+, CD4-, CD8+, T-bet+	Aktiveeritud CTL-rakud
CD3+, CD4-, CD8+, Helios+	Helios TF ekspresseerivad T-rakud
CD3+, CD4-, CD8+, Ki-67+	Jagunevad CTL-rakud
CD3+, CD4-, CD8+, EOMES+	Aktiveeritud CTL-rakud

Autor usub, et saadud paneele saaks veel edasi arendada ja paremaks muuta. Paneelide täpsust parandaks elulemus markeri (*viability dye*) kaasamine, et paremini vältida surnud rakkude kaasamist analüüsi. Kasulik oleks ka lisada juurde markereid, mis võimaldaksid paremini kirjeldada raku staatust, näiteks PD-1 kaasamine võimaldaks leida kurnatud populatsioone, mida hetkel kasutatavate paneelidega tuvastada ei saa. Soov on jätkuvalt leida viis, kuidas kaasata ühte paneeli sise- ja pinnamarkereid, see suurendaks tuvastavate populatsioonide hulka ja võimaldaks kinnitada teisi. Sellise paneeli tööle saamine vajab kindlasti juurde optimeerimise katseid, mis sisaldaksid endas ka erinevate permeabiliseerimispuhvrite võrdlusi ja värvingu aja kestvuste muutusi.

Töö tulemuste alusel saab järeldada, et spektraalsele voolutsütomeetrile optimeeritud paneelidega on võimalik eristada mitmeid T-rakkude populatsioone. Loodetavasti saab hakata loodud paneele rakendama erinevates teadusuuringutes, võrreldes raku populatsioonide muutusi, mis on seotud vananemisega või mis on tekkinud erinevate haiguste mõjul.

## KOKKUVÕTE

T-rakud on väga oluline rakugrupp, mis aitab tagada, et immuunsüsteem saaks normaalselt funktsioneerida, hoides ära nakatumise erinevatesse haigustesse. T-rakud on suures pildis jaotatud kaheks: tsütotoksilised T-rakud, mis suudavad rakke apoptoosi viia ja abistaja T-rakud, kelle rolliks on aktiveerida teisi immuunvastuses osalevaid rakke. Neid rakke on võimalik veelgi väiksemateks alapopulatsioonideks jagada, millel kõigil on oma spetsiifiline roll, kuidas kaitset täide viivad. Neid alapopulatsioone on võimalik leida ning üksteisest eristada, kui tuvastada nende pinnal ja sees olevaid retseptoreid ning valke, kasutades protsessi, mida nimetatakse immuunfenotüpiseerimiseks.

Aastaid on selleks kasutatud konventsionaalset voolutsütomeetria, mille puuduseks on piiratud arv raku markererimiseks kasutatavaid fluorokroome samaaegseks kasutamuseks. Spektraalne voolutsütomeetria on selle edasiarendus, sest tänu oma teistsugusele optilisele süsteemile, mõõdab see tervet kiirgumisspektrit. Sellega laseb paremini eristada fluorokroome üksteisest ja võimaldab ehitada suuremaid paneele ja seega proovist koguda rohkem infot. Immuunfenotüpiseerimise käigus saadud teadmisi rakupopulatsioonide suuruste ja jaotumiste kohta on oluline mitmete haiguste diagnoosiks kui jälgimiseks.

Selles magistritöös optimeeriti kaks paneeli spektraalse voolutsütomeetrile, mis põhinevad perifeerse vere mononukleaarsetele rakkudele. Paneelide optimeerimisprotsess määrati ära 68 antikeha seondumiseelistused ja nendest 50-le leiti optimaalne tiiter. Paneelid oli loodud kas rakkude pinna- või sisemarkerite tuvastamiseks, mis võimaldasid kokku eristada 35 T-rakkude populatsiooni.

## **Optimizing a T-cell panel for spectral flow cytometry**

Tuuliki Pomerants

### **SUMMARY**

T cells are an important group of cells that ensure the proper function of the immune system, preventing infections from various diseases and cancer. Broadly, T-cells are divided into two main categories: cytotoxic T cells, which can induce apoptosis in infected cells, and helper T-cells, which activate other immune cells involved in the immune response. These T-cells can be further subdivided into smaller subpopulations, each with a specific role in how they are providing protection. These subpopulations can be identified and distinguished from one another by detecting the receptors and proteins on their surface and inside them, using a process called immunophenotyping.

For years, conventional flow cytometry has been used for immunophenotyping. However, its limitation lies in the number of fluorochromes that can be detected simultaneously for cell marker identification. Spectral flow cytometry represents an advancement in this field. Due to its unique optical system, it measures the entire emission spectrum, allowing for better differentiation of fluorochromes and thus enabling the construction of larger panels, allowing one to gather more information from a single sample. The knowledge gained from immunophenotyping regarding the sizes and distributions of cell populations is crucial for both the diagnosis and monitoring of various diseases.

In this master's thesis, two panels for spectral flow cytometry were optimized, based on peripheral blood mononuclear cells. These panels were designed to detect either surface or intracellular markers. The optimization process involved determining the binding preferences of 68 antibodies, and finding the optimal titer for 50 of them. In total the panels allow for the differentiation of 35 T cell populations.

The creation of a T-cell panel for spectral flow cytometry can significantly enhance our understanding of immune responses. This has potential applications in both scientific research and clinical settings.

# Tänuõnad

Soovin väga tänada oma Jaanika Kärnerit, kes oli nõus mu magistritööd juhendama.

Samuti kõiki teisi Molekulaarpatoloogia uurimisgrupi liikmeid, kes mind töö tegemise ajal toetasid ja väärtuslikku nõu andsid.

# ALLIKAD

## Kirjanduse loetelu

- Acuto, O., & Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: A quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 939–951. <https://doi.org/10.1038/nri1248>
- AIDS ja HIV | Terviseamet.* (n.d.). Retrieved May 7, 2024, from <https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/aids-ja-hiv>
- Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Appleman, L. J., & Boussiotis, V. A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunological Reviews*, 192(1), 161–180. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00009.x>
- Bettonville, M., d’Aria, S., Weatherly, K., Porporato, P. E., Zhang, J., Bousbata, S., Sonveaux, P., & Braun, M. Y. (n.d.). Long-term antigen exposure irreversibly modifies metabolic requirements for T cell function. *eLife*, 7, e30938. <https://doi.org/10.7554/eLife.30938>
- Binder, C., Cvetkovski, F., Sellberg, F., Berg, S., Paternina Visbal, H., Sachs, D. H., Berglund, E., & Berglund, D. (2020). CD2 Immunobiology. *Frontiers in Immunology*, 11, 1090. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01090>
- Blom, K., Braun, M., Pakalniene, J., Dailidyte, L., Béziat, V., Lampen, M. H., Klingström, J., Lagerqvist, N., Kjerstadius, T., Michaëlsson, J., Lindquist, L., Ljunggren, H.-G., Sandberg, J. K., Mickiene, A., & Gredmark-Russ, S. (2015). Specificity and Dynamics of Effector and Memory CD8 T Cell Responses in Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *PLoS Pathogens*, 11(1), e1004622. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004622>

- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Supplement 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
- Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). Antigen recognition by T cells. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27098/>
- Chen, Q., Yuan, S., Sun, H., & Peng, L. (2019). CD3+CD20+ T cells and their roles in human diseases. *Human Immunology*, 80(3), 191–194. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.01.001>
- Cibrián, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). CD69: From activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*, 47(6), 946–953. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
- Clift, I. C. (2015). Diagnostic Flow Cytometry and the AIDS Pandemic. *Laboratory Medicine*, 46(3), e59–e64. <https://doi.org/10.1309/LMKHW2C86ZJDRTFE>
- Corripio-Miyar, Y., Hayward, A., Lemon, H., Sweeny, A. R., Bal, X., Kenyon, F., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Nussey, D. H., & McNeilly, T. N. (2022). Functionally distinct T-helper cell phenotypes predict resistance to different types of parasites in a wild mammal. *Scientific Reports*, 12(1), 3197. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07149-9>
- Corthay, A. (2006). A Three-cell Model for Activation of Naïve T Helper Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64(2), 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01782.x>
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., Berrino, L., Fambrini, M., Caproni, M., Tonelli, F., Lazzeri, E., Parronchi, P., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2008).

- Human interleukin 17–producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1903–1916.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20080397>
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C., & Mescher, M. F. (2003). Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1141–1151. <https://doi.org/10.1084/jem.20021910>
- den Braanker, H., Bongenaar, M., & Lubberts, E. (2021). How to Prepare Spectral Flow Cytometry Datasets for High Dimensional Data Analysis: A Practical Workflow. *Frontiers in Immunology*, 12, 768113. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.768113>
- Devi, M., Vijayalakshmi, D., Dhivya, K., & Janane, M. (2017). Memory T Cells (CD45RO) Role and Evaluation in Pathogenesis of Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 11(5), ZC84–ZC86.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26866.9930>
- Dong, C., & Flavell, R. A. (2000). Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Research & Therapy*, 2(3), 179. <https://doi.org/10.1186/ar85>
- Dzangué-Tchoupou, G., Corneau, A., Blanc, C., Benveniste, O., & Allenbach, Y. (2018). Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. *PLOS ONE*, 13(3), e0194593.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194593>
- Edwards, J. M., Andrews, M. C., Burridge, H., Smith, R., Owens, C., Edinger, M., Pilkington, K., Desfrancois, J., Shackleton, M., Senthil, S., & van Zelm, M. C. (2023). Design, optimisation and standardisation of a high-dimensional spectral flow cytometry workflow assessing T-cell immunophenotype in patients with melanoma. *Clinical & Translational Immunology*, 12(9), e1466. <https://doi.org/10.1002/cti2.1466>

*Electronics of a Flow Cytometer—EE.* (n.d.). Retrieved October 19, 2023, from

<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/electronics-flow-cytometer.html>

Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., Bensussan, A., Gattei, V., Horejsi, V., Jin, B.-Q., Malavasi,

F., Mortari, F., Schwartz-Albiez, R., Stockinger, H., van Zelm, M. C., Zola, H., & Clark,

G. (2015). CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen

Workshops as a Driving Force in Immunology. *The Journal of Immunology*, *195*(10),

4555–4563. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502033>

Fergusson, J. R., Fleming, V. M., & Klenerman, P. (2011). CD161-Expressing Human T Cells.

*Frontiers in Immunology*, *2*, 36. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00036>

Ferrer-Font, L., Small, S. J., Lewer, B., Pilkington, K. R., Johnston, L. K., Park, L. M., Lannigan,

J., Jaimes, M. C., & Price, K. M. (2021). Panel Optimization for High-Dimensional

Immunophenotyping Assays Using Full-Spectrum Flow Cytometry. *Current Protocols*,

*1*(9), e222. <https://doi.org/10.1002/cpz1.222>

Fixemer, J., Hummel, J. F., Arnold, F., Klose, C. S. N., Hofherr, A., Weissert, K., Kögl, T.,

Köttgen, M., Arnold, S. J., Aichele, P., & Tanriver, Y. (2020). Eomes cannot replace its

paralog T-bet during expansion and differentiation of CD8 effector T cells. *PLoS*

*Pathogens*, *16*(9), e1008870. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008870>

Getnet, D., Grosso, J. F., Goldberg, M. V., Harris, T. J., Yen, H.-R., Bruno, T. C., Durham, N.

M., Hipkiss, E. L., Pyle, K. J., Wada, S., Pan, F., Pardoll, D. M., & Drake, C. G. (2010).

A role for the transcription factor Helios in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.

*Molecular Immunology*, *47*(7–8), 1595–1600.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.02.001>

- Glaría, E., & Valledor, A. F. (2020). Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells*, 9(1), 228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>
- Grant, E. J., Nüssing, S., Sant, S., Clemens, E. B., & Kedzierska, K. (2017). The role of CD27 in anti-viral T-cell immunity. *Current Opinion in Virology*, 22, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.12.001>
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Experimental Cell Research*, 317(5), 620–631. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.017>
- Grover, P., Goel, P. N., & Greene, M. I. (2021). Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750542>
- Guo, L., Liu, X., & Su, X. (2023). The role of TEMRA cell-mediated immune senescence in the development and treatment of HIV disease. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1284293>
- Gustafson, C. E., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2018). T Follicular Helper Cell Development and Functionality in Immune Aging. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 132(17), 1925–1935. <https://doi.org/10.1042/CS20171157>
- Hassin, D., Garber, O. G., Meiraz, A., Schiffenbauer, Y. S., & Berke, G. (2011). Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*, 133(2), 190–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03426.x>
- Herold, N. C., & Mitra, P. (2024). Immunophenotyping. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558927/>
- Hoeppli, R. E., Wu, D., Cook, L., & Levings, M. K. (2015). The Environment of Regulatory T Cell Biology: Cytokines, Metabolites, and the Microbiome. *Frontiers in Immunology*, 6, 61. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00061>

- Johnston, R. J., Poholek, A. C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A. L., Craft, J., & Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5943), 1006–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1175870>
- Kalser, S. (2023, January 3). Roundup of Spectral Flow Cytometers. *FluoroFinder*. <https://fluorofinder.com/spectral-flow-cytometers/>
- Kizmaz, M. A., Simsek, A., Bozkurt, T., Cagan, E., Dombaz, F., Tezcan, G., Asan, A., Demir, H. I., Bal, S. H., Yoyen Ermis, D., Coskun, F., Yilmaz, E., Akalin, E. H., Oral, H. B., & Budak, F. (2023). Effector memory T cell subset CD45RA–CCR7–CD27–CD28– EM3 increases in direct proportion to the disease severity of COVID-19. *Scandinavian Journal of Immunology*, 97(1), e13217. <https://doi.org/10.1111/sji.13217>
- Konecny, A. J., Mage, P., Tyznik, A. J., Prlic, M., & Mair, F. (2023). 50-color phenotyping of the human immune system with in-depth assessment of T cells and dendritic cells (p. 2023.12.14.571745). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.12.14.571745>
- Kumar, B. V., Connors, T., & Farber, D. L. (2018). Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Coré, M., Sleurs, D., Serriari, N.-E., Treiner, E., Hivroz, C., Sansonetti, P., Gougeon, M.-L., Soudais, C., & Lantz, O. (2013). MAIT Cells Detect and Efficiently Lyse Bacterially-Infected Epithelial Cells. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003681. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003681>
- Lee, J., Ahn, E., Kissick, H. T., & Ahmed, R. (2015). Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway. *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, 6(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1615/ForumImmunDisTher.2015014188>

- Li, C., Lu, Z., Bi, K., Wang, K., Xu, Y., Guo, P., Chen, Y., Zhou, P., Wei, Z., Jiang, H., & Cao, Y. (2019). CD4+/CD8+ mucosa-associated invariant T cells foster the development of endometriosis: A pilot study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *17*(1), 78.  
<https://doi.org/10.1186/s12958-019-0524-5>
- Liechti, T., & Roederer, M. (2019). OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells. *Cytometry Part A*, *95*(11), 1129–1134.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.23853>
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., de St. Groth, B. F., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., & Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(7), 1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>
- Lozano-Ojalvo, D., López-Fandiño, R., & López-Expósito, I. (2015). PBMC-Derived T Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and ex vivo models*. Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500146/>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*, 925135.  
<https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(3), 191–200.  
<https://doi.org/10.1038/nri3158>
- Mayer, K. E., Mall, S., Yusufi, N., Gosmann, D., Steiger, K., Russelli, L., Bianchi, H. de O., Audehm, S., Wagner, R., Bräunlein, E., Stelzl, A., Bassermann, F., Weichert, W., Weber, W., Schwaiger, M., D'Alessandria, C., & Krackhardt, A. M. (2018). T-cell functionality

- testing is highly relevant to developing novel immuno-tracers monitoring T cells in the context of immunotherapies and revealed CD7 as an attractive target. *Theranostics*, 8(21), 6070–6087. <https://doi.org/10.7150/thno.27275>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Niewold, P., Ashhurst, T. M., Smith, A. L., & King, N. J. C. (2020). Evaluating spectral cytometry for immune profiling in viral disease. *Cytometry Part A*, 97(11), 1165–1179. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24211>
- Nolan, J. P., & Condello, D. (2013). Spectral Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et Al.]*, CHAPTER, Unit1.27. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0127s63>
- NovaFluor dyes for high-dimensional panel design*. (n.d.).
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., & Fischer, R. (2023). Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*, 12(14), 1875. <https://doi.org/10.3390/cells12141875>
- Rowley, T. (2023). Flow Cytometry—A Survey and the Basics. *Materials and Methods*. <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22, 745–763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Salzer, U., Sack, U., & Fuchs, I. (2019). Flow Cytometry in the Diagnosis and Follow Up of Human Primary Immunodeficiencies. *EJIFCC*, 30(4), 407–422.

- Saper, C. B. (2009). A Guide to the Perplexed on the Specificity of Antibodies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(1), 1–5. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952770>
- Saraiva, D. P., Azeredo-Lopes, S., Antunes, A., Salvador, R., Borralho, P., Assis, B., Pereira, I. L., Seabra, Z., Negreiros, I., Jacinto, A., Braga, S., & Cabral, M. G. (2021). Expression of HLA-DR in Cytotoxic T Lymphocytes: A Validated Predictive Biomarker and a Potential Therapeutic Strategy in Breast Cancer. *Cancers*, 13(15), 3841. <https://doi.org/10.3390/cancers13153841>
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J. J. C., Bickham, K. L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., Kato, T., & Farber, D. L. (2013). Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*, 38(1), 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.020>
- Saule, P., Trauet, J., Dutriez, V., Lekeux, V., Dessaint, J.-P., & Labalette, M. (2006). Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(3), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.11.001>
- Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J., & Kazi, J. U. (2021). T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>
- Shevchenko, Y., Lurje, I., Tacke, F., & Hammerich, L. (2023). *Fluorochrome-dependent specific changes in spectral profiles using different compensation beads or human cells in full spectrum cytometry* (p. 2023.06.14.544540). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.06.14.544540>
- Soares, A., Govender, L., Hughes, J., Mavakla, W., de Kock, M., Barnard, C., Pienaar, B., Janse van Rensburg, E., Jacobs, G., Khomba, G., Stone, L., Abel, B., Scriba, T. J., & Hanekom,

- W. A. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *Journal of Immunological Methods*, 362(1–2), 43–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.08.007>
- Soudja, S. M., Chandrabos, C., Yakob, E., Veenstra, M., Palliser, D., & Lauvau, G. (2014). Memory T Cell-Derived interferon- $\gamma$  Instructs Potent Innate Cell Activation For Protective Immunity. *Immunity*, 40(6), 974–988.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.005>
- Spectral Flow Cytometry Fundamentals—EE*. (n.d.). Retrieved May 25, 2024, from  
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-learning-center/flow-cytometry-resource-library/flow-cytometry-methods/spectral-flow-cytometry-fundamentals.html>
- Spranger, S. (2016). Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *International Immunology*, 28(8), 383–391. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw014>
- Straus, D. B., & Weiss, A. (1993). The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(5), 1523–1530.  
<https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1523>
- Suthanthiraraj, P. P. A., & Graves, S. W. (2013). Fluidics. *Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J. Paul Robinson, Managing Editor ... [et Al.]*, 0 1, Unit-1.2.  
<https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0102s65>
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*, 100(6), 655–669. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3)

- Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L., & Wei, W. (2018). Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 642. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00642>
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Walker, J. A., & McKenzie, A. N. J. (2018). TH2 cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 121–133. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>
- Whyte, C. E., Tumes, D. J., Liston, A., & Burton, O. T. (2022). Do more with Less: Improving High Parameter Cytometry Through Overnight Staining. *Current Protocols*, 2(11), e589. <https://doi.org/10.1002/cpz1.589>
- Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R., & Vignali, D. A. A. (2009). The Development and Function of Regulatory T Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(16), 2603. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0026-2>
- Yi, J. S., Cox, M. A., & Zajac, A. J. (2010). T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion. *Immunology*, 129(4), 474–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x>
- Zhang, J., He, T., Xue, L., & Guo, H. (2021). Senescent T cells: A potential biomarker and target for cancer therapy. *eBioMedicine*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103409>

## Kasutatud veebiallikad

AIDS ja HIV | Terviseamet. (n.d.). Retrieved May 7, 2024, from

<https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/aids-ja-hiv>

Electronics of a Flow Cytometer—EE. (n.d.). Retrieved October 19, 2023, from

<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/electronics-flow-cytometer.html>

Spectral Flow Cytometry Fundamentals—EE. (n.d.). Retrieved May 25, 2024, from

<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-learning-center/flow-cytometry-resource-library/flow-cytometry-methods/spectral-flow-cytometry-fundamentals.html>

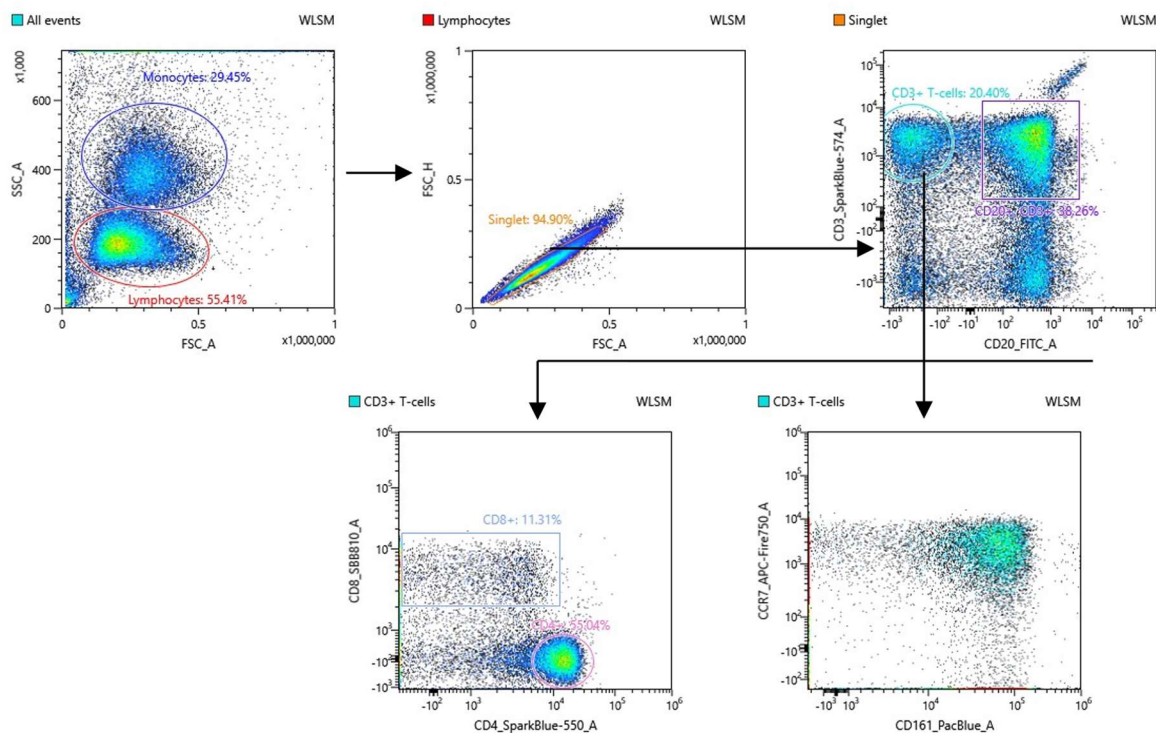
# LISAD

## Lisa 1. Töös kasutatud antikehade tootjate nimekiri

Antikeha	Kloon	Fluorokroom	Tootja
CCR7	G043H7	APC/Fire 750	BioLegend
CD11b	ICRF44	NovaFluor Yellow 590	ThermoFisher
CD11c	3.9	Brilliant Violet 421	BioLegend
CD123	6H6	SuperBright 436	ThermoFisher
CD127	CD28.2	PE-Cy5	BioLegend
CD127	eBioRDR5	NovaFluor Yellow 610	Thermo Fisher
CD127	A019D5	Brilliant Violet 510	BioLegend
CD14	61D3	Alexa Fluor 532	Invitrogen
CD15	HI98	SparkViolet 423	BioLegend
CD16	eBioCB16	NovaFluor Yellow 730	ThermoFisher
CD16	3G8	SparkBlue 515	BioLegend
CD161	HP-3G10	Alexa Fluor 647	BioLegend
CD161	HP-3G10	Pacific Blue	BioLegend
CD19	HIB19	APC	BioLegend
CD19	HIB19	Bright Blue 515	BD Biosciences
CD19	HIB19	NovaFluor Blue 510	ThermoFisher
CD20	2H7	FITC	BioLegend
CD21	Bu32	APC	BioLegend
CD24	SN3	PE-Alexa Fluor 610	Invitrogen
CD24	SN3	StarBright Blue 700	Bio-Rad
CD25	M-A251	PE/Fire 640	BioLegend
CD27	A019D5	APC	BioLegend
CD27	O323	NovaFluor Red 725	ThermoFisher
CD27	O323	Alexa Fluor 700	BioLegend
CD3	SK7	APC	BioLegend
CD3	OKT	APC	BioLegend
CD3	OKT3	NovaFluor Blue 585	ThermoFisher
CD3	UCHT1	SparkBlue 574	BioLegend
CD3	UCHT1	StarBrightBlue 765	Bio-Rad
CD307d	413D12	PE	BioLegend
CD33	WM53	NovaFluor Yellow 660	ThermoFisher
CD33	P67.6	SparkYG 581	BioLegend
CD38	HB-7	APC/Fire™ 810	BioLegend
CD39	eBioA1	NovaFluor Yellow 755	ThermoFisher
CD4	SK3	SparkBlue 550	BioLegend
CD45RA	HI100	PE-Cy7	BioLegend
CD45RA	HI100	Brilliant Violet 570	BioLegend
CD56	HCD56	Brilliant Violet 650	BioLegend
CD57	QA17A04	Brilliant Violet 785	BioLegend
CD8a	RPA-T8	Brilliant Violet 605	BioLegend
CD8a	OKT8	NovaFluor Blue 610	ThermoFisher
CD8	LT8	StarBright Blue 810	Bio-Rad
CD8	LT8	StarBright Blue 615	Bio-Rad
CXCR3	G025H7	APC	BioLegend
CXCR3	G025H7	PE-Fire 810	BioLegend
CXCR5	J252D4	Brilliant Violet 421	BioLegend

CXCR5	J252D4	Brilliant Violet 750	BioLegend
EOMES	WD1928	Alexa Fluor 660	Invitrogen
FOXP3	259D	Alexa Fluor 488	Invitrogen
FOXP3	206D	SparkNIR 685	BioLegend
HELIOS	22F6	Spark YG 581	BD Biosciences
HELIOS	22F6	PE	BioLegend
HLA-DR	L243	Brilliant Violet 510	BioLegend
HLA-DR	LN3	NovaFluor Blue 660	ThermoFisher
ICOS	ISA-3	NovaFluor Yellow 700	ThermoFisher
ICOS	397.4A	PE-Cy5	BioLegend
ICOS	ISA-3	PE-Cy5.5	Invitrogen
IgD	IA6-2	PE	BioLegend
IgD	IA6-2	Brilliant Violet 480	BD Biosciences
IgM	MHM-88	Pe-Cy7	BioLegend
Ki-67	20Raj1	PE-eFluor 610	ThermoFisher
PD1	EH12.2H7	Brilliant Violet 711	BioLegend
T-bet	4B10	Brilliant Violet 605	BioLegend
TCR Va24-Ja18	6B11	Brilliant Violet 510	BioLegend
TCR Va7.2	3C10	Brilliant Violet 510	BioLegend
TCR Va7.2	HP-3G10	Pacific Blue	BioLegend
TCR Va7.2	3C10	Alexa Fluor 647	BioLegend
TCR $\gamma\delta$	B1.1	PerCP-eFluor 710	Invitrogen

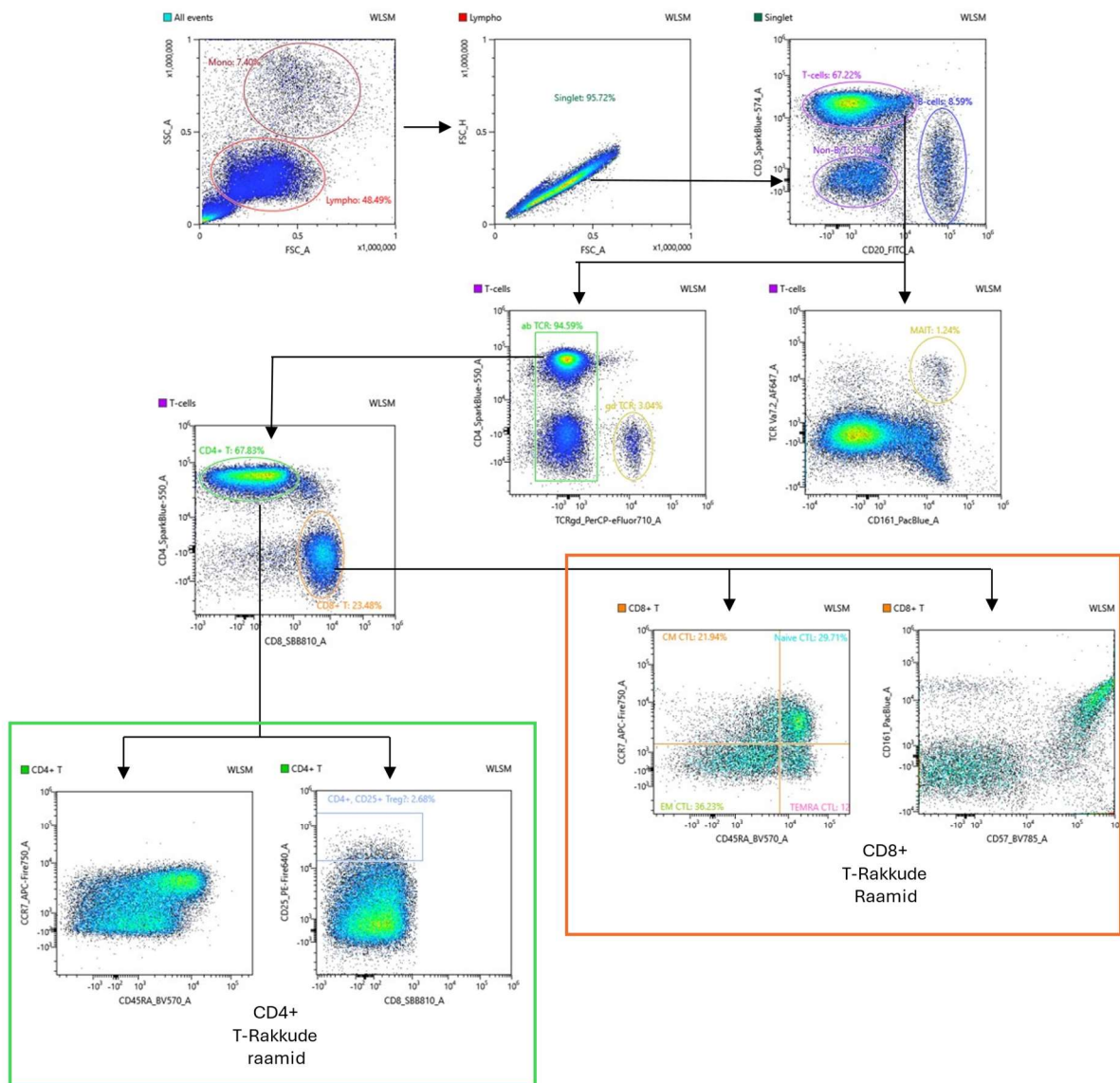
## Lisa 2. Paneelid mis ei töötanud



**Joonis 14. Paneel, mis sisaldas pinna- ja sisemarkereid.** Selle paneeli puhul analüüs lõpetati vara, sest rakupopulatsioonide eraldamisel nähti tulemusi, mis ei lähe kokku kirjandusega. Näiteks sai eraldada CD3+ ja CD20+ ekspresseerivaid rakke väga suures hulgas, kuid need peaks olema perifeerses veres 3-5% (*Chen et al., 2019*). Samuti on siin näha raamide suur kokkulangevust CD4 ja CD8 osas, mis ei luba kindel olla nende populatsioonide edukas eristumises. CD161 ja TCR V $\alpha$ 7.2 raami puhul, mida kasutakse MAIT rakkude eristamiseks oli tulemus selline, mis viitaks, et enamik rakke on kõrge TCR V $\alpha$ 7.2 ja CD161 ekspressiooniga, kuigi jällegi MAIT populatsioon on perifeerses veres väike. Paneelis on tulemused, mis mõõdeti doonori MP-2 rakkudelt.

**Tabel 9. Antikehade tabel, mida pinna- ja sisemarkerite paneelis kasutati**

Lisamise järjekord	Antikehad
1. segu, fikseerimata rakkudele	CXCR5, TCR $\gamma\delta$ , CXCR3, CCR7
2. segu, fikseerimata rakkudele	IgD, CD127, CD25, CD16, TCRV $\alpha$ 7.2, CD27, CD38
3. segu, fikseeritud rakkudele	CD11c, CD15, CD123, CD161, CD45RA, IgD, CD56, CD57, CD20, CD4, CD14, CD3, HLA-DR, CD24, CD8, CD39, IgM, CD21
4. segu, permeabiliseeritud rakkudele	T-bet, Helios, Ki-67, FoxP3



**Joonis 15. Sisemarkeritele loodud paneel eelnev versioon.** Ka selles esinesid probleemid raku populatsioonide eristamisega, mida illustreerib CD4+ rakkude puhul mälu populatsioonide leidmiseks mõeldud CD45RA ja CCR7 kasutatav raam ja CD8+ rakkude puhul CD57+ omava populatsiooni leidmiseks loodud raam. Nende tulemuste põhjal otsustati selle paneeli tulemuste analüüsiga mitte jätkata. Paneels kasutati doonori MP-3 PBMC-sid

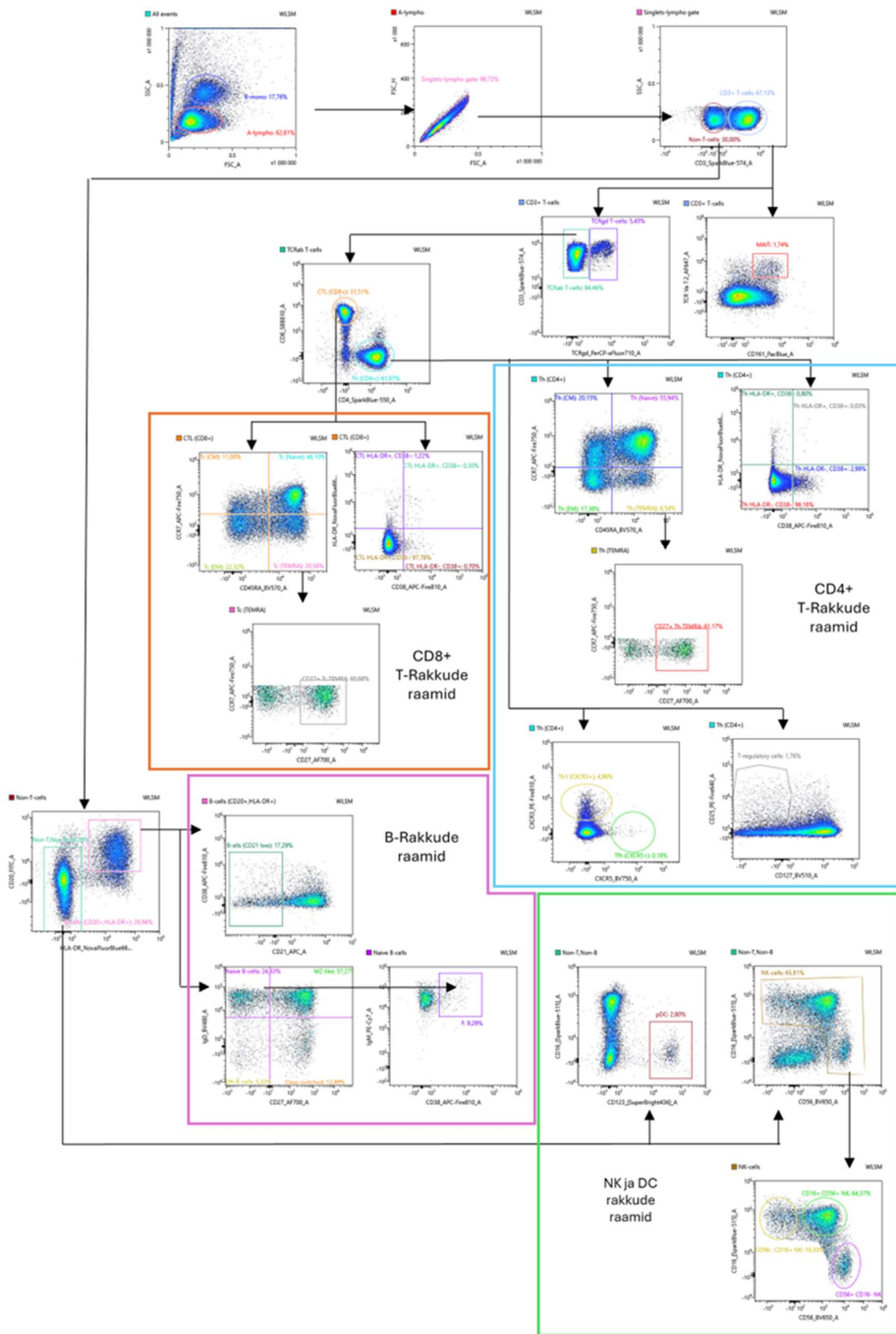
**Tabel 10. Antikehade tabel, mida pinnamarkerite paneeli eelmises versioonis kasutati**

Lisamise järjekord	Antikehad
1. segu, fikseerimata rakkudele	CXCR5, TCR $\gamma\delta$ , CXCR3, CCR7
2. segu, fikseerimata rakkudele	CD25, CD16, TCRVa7.2, CD27, CD38
3. segu, fikseeritud rakkudele	CD11c, CD15, CD123, CD161, CD45RA, IgD, CD56, CD57, CD20, CD4, CD14, CD3, HLA-DR, CD24, CD8, CD39, IgM, CD21

### Lisa 3. Pinnamarkerite paneelist kõik tuvastatavad rakupopulatsioonid ja nende raamide strateegia

**Tabel 11. Pinnamarkerite paneeliga leitavad rakupopulatsioonid.** Välja toodud markerid ja kuidas neid kasutati populatsioonide eristamiseks

Marker(id)	Populatsioon
CD3+	T-rakud
CD3+, TCR $\gamma\delta$ +	$\gamma\delta$ T-rakud
CD3+, TCR $\gamma\delta$ -	$\alpha\beta$ T-rakud
CD3+, CD161+, TCRV $\alpha$ 7.2	MAIT-rakud
CD3+, CD4-, CD8+	CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7+, CD45RA+	Naiivsed CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA+	CTL TEMRA rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA+, CD27+	Pre-efektor CTL TEMRA rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA+, CD27-	Efektor CTL TEMRA rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7-, CD45RA-	Efektor mälu CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, CCR7+, CD45RA-	Tsentraalsed mälu CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR+, CD38-	Aktiveerunud CTL rakud, APC omadustega
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR+, CD38+	Aktiveeritud CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR-, CD38+	Naiivsed või aktiveeritud CTL rakud
CD3+, CD4-, CD8+, HLA-DR-, CD38-	Mitte-aktiveeritud CTL rakud
CD3+, CD4+, CD8-	Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7+, CD45RA+	Naiivsed Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA+	Th TEMRA rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA+, CD27+	Pre-efektor Th TEMRA rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA+, CD27-	Efektor Th TEMRA rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7-, CD45RA-	Efektor mälu Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CCR7+, CD45RA-	Tsentraalsed mälu Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR+, CD38-	Aktiveerunud Th rakud, APC omadustega
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR+, CD38+	Aktiveeritud Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR-, CD38+	Naiivsed või aktiveeritud Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, HLA-DR-, CD38-	Mitte-aktiveeritud Th rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CD25+, CD127 <sup>low</sup>	Treg
CD3+, CD4+, CD8-, CXCR3+	Th1 rakud
CD3+, CD4+, CD8-, CXCR5+	Tfh rakud
CD3-	Mitte T-rakud
CD3-, CD20-, HLA-DR-	Mitte T-rakud, Mitte B-rakud
CD3-, CD20-, HLA-DR-, CD16+, CD56-	CD16+, CD56- NK-rakud
CD3-, CD20-, HLA-DR-, CD16+, CD56+	CD16+, CD56+ NK-rakud
CD3-, CD20-, HLA-DR-, CD16-, CD56+	CD16-, CD56+ NK-rakud
CD3-, CD20-, HLA-DR-, CD16-, CD123+	Plasmatsütoitsed dendriittrakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+	B-rakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+, CD21 <sup>low</sup>	CD21 <sup>low</sup> B-rakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+, IgD-, CD27+	Naiivsed B-rakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+, IgD-, CD27+, IgM+, CD38+	Plasmarakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+, IgD+, CD27+	Marginaal tsooni sarnased B-rakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+, IgD-, CD27+	Klassi vahetanud B-rakud
CD3-, CD20+, HLA-DR+, IgD-, CD27-	Topelt negatiivsed B-rakud



**Joonis 16 .Kõik populatsioonid, mis on võimalik optimeeritud pinnamarkerite paneeliga tuvastada. Kokku on võimalik tuvastada 42 eri populatsiooni. Paneelis kasutatud doonorit N32**

# Lihtlitsents

Mina, Tuuliki Pomerants,

Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose:

„T-raku paneeli optimeerimine spektraalse voolutsütomeetri jaoks“,

mille juhendaja on Jaanika Kärner

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i 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.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Tuuliki Pomerants*

**30.05.2024**