TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Geenikspressioon 65-aastaste ja vanemate indiviidide $CD8^+$ T_{EMRA} ning $CD8^+$ CMV-spetsiifilistes T-rakkudes

Bakalaureusetöö

12 EAP

Liisa-Miina Pilv

Juhendajad MSc Lehte Türk

PhD Liina Tserel

PhD, MD Viljar Jaks

TARTU 2022

Geenikspressioon 65-aastaste ja vanemate indiviidide $CD8^+$ T_{EMRA} ning $CD8^+$ CMV-spetsiifilistes T-rakkudes

$CD8^+$ T_{EMRA} rakud on hilises diferentseerumisastmes T-rakud, mis ei suuda enam jaguneda, kuid on siiski efektorraku funktsionaalsusega. T_{EMRA} rakud kuhjuvad nii vananedes kui CMV-infektsiooni järel. Nende rakkude osakaalu suurenemist $CD8^+$ T-mälurakkude populatsioonis on seostatud kroonilise põletikulise seisundi püsimisega vanematel inimestel, mis võib põhjustada ja süvendada autoimmuunhaiguseid. Samuti kahtlustatakse, et $CD8^+$ T_{EMRA} rakkudel on roll vanemate inimeste vähenenud vaktsiinivastustes. Käesolevas töös mõõdeti reaalaja-PCR meetodil 29 geeni ekspressiooni 65-aastaste ja vanemate inimeste erinevates $CD8^+$ T-raku populatsioonides ja võrreldi tulemusi populatsiooniti.

Märksõnad: vananev immuunsus, T_{EMRA}, $CD8^+$, tsütomegaloviirus

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Gene expression in the $CD8^+$ T_{EMRA} and $CD8^+$ CMV-positive T cells of people aged 65 and above

$CD8^+$ T_{EMRA} cells are late-stage differentiated T cells that are incapable of proliferation yet maintain their effector functions. They have been shown to accumulate with aging as well as after infections like CMV. The accumulation of T_{EMRA} cells is associated with a chronic inflammatory state in the elderly, which can cause and aggravate autoimmune diseases. In addition, $CD8^+$ T_{EMRA} cells have been implicated in poorer vaccine responses in elderly people. This study aims to measure and compare the expression of 29 different genes using RT-PCR in various $CD8^+$ T cell populations of people aged 65 and above.

Keywords: aging immunity, T_{EMRA}, $CD8^+$, cytomegalovirus

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD **3**

KASUTATUD LÜHENDID **5**

SISSEJUHATUS **7**

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE **8**

1.1. Vananemisega seotud muutused rakkudes 8

1.2. Vananev immuunsüsteem 9

1.3. T-rakud 11

1.3.1. Naiivsed T-rakud 12

1.3.2. T-mälurakud 13

1.3.3. T_{EMRA} rakud 13

1.4. Tsütomegaloviirus 16

1.4.1. CMV-spetsiifilised T-rakud 16

2. EKSPERIMENTAALOSA **18**

2.1. Töö eesmärgid 18

2.2. Materjal ja metoodika 18

2.2.1. Valimi kirjeldus 18

2.2.2. Rakkude stimulatsioon ja sortimine 18

2.2.3. RNA eraldamine 20

2.2.4. cDNA süntees 21

2.2.5. Uuritavad geenid ja kasutatud ekspressioonipraimerid 21

2.2.6. Reaalaja-PCR 22

2.2.7. Andmeanalüüs 23

2.3. Tulemused 23

2.3.1. Tsütotoksilisuse geenide ekspressioon 23

2.3.2. NK-rakkudele omaste retseptorite ekspressioon 25

2.3.3. Tsütokiinide ja tsütokiinide retseptorite ekspressioon 27

2.3.4. Transkriptsioonifaktorite ekspressioon 28

2.3.5. Kostimulatoorsete molekulide ekspressioon 28

2.3.6. Muu funktsiooniga geenide ekspressioon 29

2.4. Arutelu 30

2.4.1. $CD8^+$ T_{EMRA} rakkude geeniekspressioon 31

2.4.2. $CD8^+$ CMV-spetsiifiliste T-rakkude geeniekspressioon 33

KOKKUVÕTE **36**

SUMMARY **37**

TÄNUSÕNAD **38**

KIRJANDUSE LOETELU **39**

LISAD **49**

LIHTLITSENTS **50**

KASUTATUD LÜHENDID

AIDS	omandatud immuunpuudulikkuse sündroom
β2M	beeta-2-mikroglobuliin
BACH2	BTB (ingl. k *broad complex-tramtrack-bric a brac*) domeeni ja CNC (ingl. k *cap'n'collar*) homoloog 2
BCL2	B-raku lümfoom 2, ingl. k *B-cell lymphoma 2*
BCL2L1	B-raku lümfoom 2 sarnane valk, ingl. k *B-cell lymphoma 2 like protein 1*
CCR	C-C motiiviga kemokiini retseptor, ingl. k *C-C motif chemokine receptor*
CCL	C-C motiiviga kemokiini ligand, ingl. k *C-C motif chemokine ligand*
CD	diferentseerumise klaster, ingl. k *cluster of differentiation*
CMV	tsütomegaloviirus
EBV	Epstein-Barri viirus
EGR2	varajane kasvu vastusvalk 2, ingl. k *early growth response protein 2*
EOMES	eomesodermiin
GNLY	granlüsiin
GZM	gransüüm
HIV	inimese immuunpuudulikkuse viirus
ICOS	indutseeritav T-raku kostimulaator, ingl. k *inducible T cell costimulator*
IFN	interferoon
IFNGR2	interferoon-gamma retseptor 2
IL	interleukiin
IL2RA	interleukiin-2 retseptori alfa subühik
MEM	T-mälurakk
MHC	koesobivusantigeen, ingl. k *major histocompatibility complex*
NK-rakk	loomulik tappurrakk, ingl. k *natural killer cell*
NKG7	loomuliku tappurraku graanulivalk 7, ingl. k *natural killer cell granule protein 7*

PD-1	programmeeritud rakusurma valk 1, ingl. k *programmed cell death protein 1*
PRF1	perforiin-1
RUNX3	kidurusega seotud transkriptsioonifaktor 1, ingl. k *runt-related transcription factor 3*
SASP	senestsentsile omane sekretoorne profiil, ingl. k *senescence-associated secretory phenotype*
SELL	L-selektiin
SLAM	signaleeriv lümfotsüütilise aktivatsiooni molekul, ingl. k *signalling lymphocytic activation molecule*
T-bet	T-rakkudes ekspresseeritav t-järjestuse valk, ingl. k *T-box protein expressed in T cells*
TCR	T-raku retseptor
T_{CM}	tsentraalsed T-mälurakud, ingl. k *central memory T cell*
T_{EM}	efektor-T-mälurakud, ingl. k *effector memory T cell*
T_{EMRA}	lõplikult diferentseerunud efektor-T-mälurakud, mis re-ekspresseerivad CD45RA retseptorit, ingl. k *terminally differentiated effector memory T cells that re-express CD45RA*
TNF-α	kasvaja nekroosifaktor-alfa, ingl. k *tumor necrosis factor alpha*
VZV	varicella-zoster viirus
XCL1	X-C-motiiviga kemokiini ligand 1, ingl. k *X-C motif chemokine ligand 1*

SISSEJUHATUS

Immuunsüsteem, nagu kõik teised organid ja rakud inimese kehas, vananeb ning sellega kaasnevad mitmed anatoomilised ja füsioloogilised muutused. Vanemad inimesed on vastuvõtlikumad nakkushaigustele, on suurema autoimmuunhaiguste tekke riskiga ning nende immuunsüsteem tuleb halvemini toime uute patogeenidega (Zhang jt, 2021). Viimast näitlikustab muuhulgas vanemates inimestes vaktsineerimisjärgselt nõrgema immuunkaitse tekkimine (Goronzy ja Weyand, 2019). Viimasel ajal on järjest rohkem tähelepanu pööratud vanemate inimeste immuunvastuse tugevdamisele, et võimaldada tervemat elu ka hilistes eluaastates. Enne kliiniliselt rakendatavaid lahendusi on oluline aga mõista, millised muutused vananevas immuunsüsteemis täpsemalt aset leiavad ja kas ning kuidas need mõjutavad immuunsüsteemi kaitsefunktsiooni langust.

Üks seni tuvastatud vanusega kaasnev muutus on lõplikult diferentseerunud tsütotoksiliste $CD8^+$ T-rakkude kuhjumine. Selliseid rakke nimetatakse T_{EMRA}-deks ning neid iseloomustab säilinud efektorraku funktsioon ja võimetus jaguneda. Tegemist on antigeen-spetsiifiliste rakkudega, kellel on tugev põletikku esilekutsuv võime. Seetõttu on nende osakaalu suurenemist seostatud nii halvemate vaktsiinivastustega kui põletikulistest protsessidest tingitud autoimmuunhaiguste tekke ja süvenemisega. Lisaks vanusele on T_{EMRA} rakkude kuhjumisega seostatud ka selliste latentsete viirusinfektsioonide väljakujunemist nagu näiteks tsütomegaloviirusinfektsioon (CMV) (Wertheimer jt, 2014).

Käesoleva töö eesmärgiks oli mõõta ja võrrelda 65-aastaste ja vanemate inimeste erinevate $CD8^+$ T-raku populatsioonide geeniekspressiooni mustreid. Uuritud $CD8^+$ T-raku populatsioonide hulgas olid naiivsed rakud, mälurakud, T_{EMRA} rakud ja CMV-spetsiifilised rakud. Geeniekspressiooni mõõdeti kasutades reaalaja-PCR meetodit.

Töö eksperimentaalne osa valmis Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas bio- ja siirdemeditsiini instituudis molekulaarpatoloogia uurimisrühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Vananemisega seotud muutused rakkudes

Bioloogiliste protsesside lahutamatuks osaks on vananemine: funktsionaalsuse järkjärguline vähenemine nii organismi kui ka rakulisel ning molekulaarsel tasemel (Yan jt, 2021). Vanusega kuhjuvaid ebapiisava funktsionaalsusega rakke on seostatud kardiovaskulaarsete ja neurodegeneratiivsete haiguste patogeneesiga, samuti arvatakse neid loovat soodsat keskkonda vähirakkude kasvuks (Campisi, 2005; Gao jt, 2022; Yan jt, 2021). Rakkudes toimuvad mitmed ehituslikud ja talituslikud muutused, mida peetakse just vananemisele omaseks: genoomi stabiilsuse vähenemine, proteostaasi häirumine, modifitseeritud tundlikkus toitainetele ja rakuvälistele signaalidele, rakuline senestsents jm (Joonis 1) (López-Otín jt, 2013).

Genoomi terviklikkuse eest vastutavad süsteemid ei ole alati efektiivsed ning seetõttu kuhjuvad ajas mutatsioonid, nii DNA-s endas kui histoonikompleksides, mille ümber DNA organiseerub. (López-Otín jt, 2013; Moskalev jt, 2013). Sealjuures on eriti tundlikud kromosoomide otstes paiknevad telomeerid, mis lühenevad iga rakutsükliga ja piisavalt ulatusliku genoomse informatsiooni kaotuse korral lõpetavad rakud jagunemise (Gao jt, 2022). Seisundit, kus rakk on veel metaboolselt aktiivne ent ei suuda jaguneda ka mitogeenide juuresolekul, tuntakse raku vananemisena (*cellular senescence*) (Calcinotto jt, 2019). Raku vananemine on organismi jaoks oluline viis eemaldada kahjustunuid ja vähieelseid rakke, kuid arvatakse, et vanusega häirub selliste rakkude asendamine jagunemisvõimeliste nooremate rakkudega (López-Otín jt, 2013). Samuti on leitud, et vananenud rakkudel avaldub omapärane sekretoom, mida tuntakse SASP-ina (*senescence-associated secretory phenotype*) (Coppé jt, 2010). Sekretoom koosneb põhiliselt immuunmoduleerivatest molekulidest nagu tsütokiinid ja ka kasvufaktoritest ning just SASP-il arvatakse olevat muuhulgas vähirakkude kasvu soodustav efekt (Calcinotto jt, 2019; Coppé jt, 2010).

Joonis 1. Vananemisega seotud muutused inimese rakkudes. Joonisel on kirjeldatud üheksat põhilist kõrvalekallet normaalsest talitlusest, mis viitavad vananenud rakule. Vananenud rakus on kogunenud mutatsioone, nii DNA-s endas kui epigenoomis. Vananenud rakus on häirunud proteoomi stabiilsuse säilitamine, mis hõlmab nii korrektselt voltunud proteiinide stabiliseerimist kui valesti voltunud või ebavajalike proteiinide lüüsimist. Vananemisega on seostatud mitokondri väiksemat võimekust ATP-d sünteesida. Samuti on tuvastatud muutusi signaaliülekannetes, nii rakkudevahelises signalisatsioonis kui toitainete kättesaadavust seiravates signaalradades. Viimase puhul on näiteks leitud, et anaboolsete signaalide rohkus kiirendab vananemist. Samuti on vananemisel olulised mehhanismid nii tüvirakkude populatsiooni kahanemine kui senestsentslike rakkude kuhjumine. (Joonis ja allkiri modifitseeritud López-Otín jt, 2013 põhjal)

1.2. Vananev immuunsüsteem

Ka immuunsüsteemi rakkudes toimuvad samasugused protsessid ning ajaga rakkude funktsionaalsus väheneb. Koos muutustega immuunsuse mitterakulistes komponentides nimetatakse immuunsüsteemi üldist funktsionaalsuse langust immuunvananemiseks (*immunosenescence*) (Nikolich-Žugich, 2018). Kui esimesed paar kümnendit inimese elust on olulised immuunsüsteemi mitmekesise mälu loomiseks, siis alates 50. eluaastast võibki

olulisemaks takistuseks pidada loodud immuunsuse kaitsefunktsiooni säilitamist (Goronzy ja Weyand, 2013). Häireid viimases seostatakse vanurites kõrgema suremusega nakkushaigustesse, suurenenud autoimmuunhaiguste riskiga ja ka vaktsiinide madalama efektiivsusega (Cavanagh jt, 2012; Gustafson jt, 2020). Nakkushaigused, mis on vanematele inimestele statistiliselt ohtlikumaks osutunud, on muuhulgas A-gripiviiruste põhjustatud gripp, varicella-zoster viiruse (VZV) põhjustatud vöötohatis ja *Streptococcus pneumoniae* põhjustatud kopsupõletik (Chua ja Chen, 2010; Dugan jt, 2020; Gustafson jt, 2020). Nimetatud haiguste vastaste vaktsiinide efektiivsust on vanemates inimestes samuti uuritud. Gripivaktsiini puhul leiti, et vanematel inimestel oli vaktsiinijärgselt madalam antikehade tootmine kui nooremas populatsioonis, teises uuringus täheldati, et tekkinud antikehad olid kehvemad viiruse neutraliseerijad (Henry jt, 2019; van den Berg jt, 2018). VZV vaktsiini uuringutes leiti, et vanemates inimestes tekkis pärast vaktsineerimist vähem pikaealisi mälu-T-rakke võrreldes noorematega, kuna ellu jäi vähem efektor-T-rakke, mis suudaks mälurakkudeks diferentseeruda ja immuunmälu säilitada (Qi jt, 2016). Siinkohal on aga oluline märkida, et seosed kehvemate vaktsiinivastuste ja vanema immuunsuse vahel pole ühesed: kasvõi eelnevalt mainitud VZV vaktsiini uuringutes leiti, et vaktsiinivastuse kulg oli esimesed 2 nädalat pärast vaktsineerimist (ehk enne mälurakkude teket) vanusest sõltumatu (Qi jt, 2016). Uuringuid teeb keerukaks nii erinevused vaktsiinide mehhanismide vahel kui ka immuunvastuste heterogeenne loomus, mis kokkupanduna nõuavad laiamastaabilisi longitudinaalseid uuringuid üldisemate seoste leidmiseks (Gustafson jt, 2020; Pawelec, 2018).

Milliseid vanusega kaasnevaid muutusi on aga immuunsüsteemis täpsemalt täheldatud? Võimast, ent väikse spetsiifikaga esmast kaitseliini ehk kaasasündinud immuunsust on siinkohal vähem uuritud kui suurema patogeenide spetsiifikaga omandatud immuunsust (Biron, 2016; Nikolich-Žugich, 2018). Kaasasündinud immuunsuse komponentidest on nt vanemates neutrofiilides märgatud langenud fagotsütoosivõimet ja madalamat reaktiivsust aktiveerivatele signaalidele (Montgomery ja Shaw, 2015; van Duin jt, 2007). Loomulike tappurrakkude (NK-rakud; *natural killer cells*) populatsioonis on vanusega märgata kõrgemalt diferentseerunud rakkude osakaalu suurenemist, millel on omakorda madalam reaktsioonivõime tsütokiinidele ja madalam tsütotoksilisus kui nooremates NK-rakkudes (Solana jt, 2012). Üldiselt võib kirjeldada vananenud kaasasündinud immuunsust kui vähem reaktiivsena, sealjuures tuleb aga nentida, et seni on saadud tulemusi suuresti *in vitro* katsetega, kus on keeruline eristada väliskeskkonna ja vanuse mõju rakkude talitlusele (Nikolich-Žugich, 2018).

Omandatud immuunsüsteem jaotub humoraalseks ja rakuliseks immuunsuseks: humoraalse immuunsuse põhikomponentideks on B-lümfotsüüdid (edaspidi B-rakud) ja nende toodetud

antikehad, rakulist immuunsust vahendavad T-lümfotsüüdid (edaspidi T-rakud) (Abbas jt, 2017). B-rakkude populatsioonis toimuvad vananedes proportsioonilised nihked, rohkem on antigeen-spetsiifilisi B-rakke, sealjuures suureneb selliste B-rakkude osakaal, mis on spetsiifilised mingi peremeesvalgu (autoantigeeni) suhtes (Kogut jt, 2012). Samuti on leitud, et vanemates inimestes on B-rakkude antigeeni retseptorite mitmekesisus ehk B-rakkude repertuaar vähenenud, eriti prominentne langus esines kaasuvate haigustega vanurites (Gibson jt, 2009). Selle võimalikuks tagajärjeks on kehvemad esmased immuunvastused: tekivad madalama afiinsusega antikehad, mille kaitsevõime on suboptimaalne (Kogut jt, 2012).

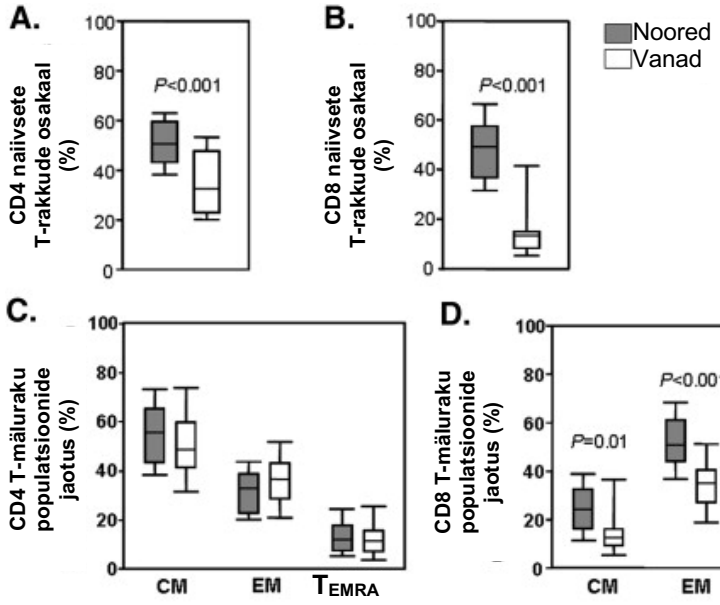
Käesolev töö uurib aga just T-rakkude vahendatud omandatud immuunsuse vananemist. Üldjoontes võib T-rakkudes märgata sarnaseid muutusi, mis humoraalses immuunsuseski: T-rakkude üldpopulatsioonis toimuvad nihked diferentseeritumate rakkude suunas ning rakkude aktiveeritavus patogeenide poolt on kahanenud. Järgnev töö osa tutvustab lähemalt praeguseid teadmisi T-rakulise immuunsuse vananemisest ning millised küsimused on veel uurimisjärgus.

1.3. T-rakud

T-rakud on osa omandatud immuunsuse rakulisest kaitsest, mis tuvastavad spetsiifiliste antigeenide retseptoritega patogeene ja aktiveerivad immuunvastuse (Seddon ja Yates, 2018). T-rakud arenevad hematopoeetilistest tüvirakkudest ja läbivad tüümuses mitmeid selektsiooni ning küpsemise etappe, kuniks väljuvad naiivsete ehk antigeeniga veel kokku puutumata rakkudena (Seddon ja Yates, 2018). Interaktsioonid T-raku retseptori (TCR, *T cell* receptor) ja peptiid-MHC (*major histocompatibility complex*) komplekside vahel määravad naiivse T-raku edasise saatuse, diferentseerudes nii lühiealiseks efektorrakuks kui pikema rakutsükliga mälurakuks (Sallusto jt, 2004). Diferentseerunud T-rakud on olulised immunoloogilise mälu kujundamisel ja säilitamisel, mille abil on organism vastupidavam korduvatele infektsioonidele (Zhang jt, 2021).

T-rakkude pinnal ekspresseeruvate koretseptorite alusel jagunevad T-rakud kahte suurde klassi: $CD4^+$ ja $CD8^+$ T-rakud. $CD4^+$ rakkudel on immuunvastust vahendav ja reguleeriv funktsioon, $CD8^+$ tsütotoksilised rakud aga osalevad immuunvastuses vahetult, elimineerides ohuna tuvastatud rakke (Germain, 2002). $CD8^+$ T-rakkudele keskendub ka antud uurimistöö. On leitud, et kuigi vanusega kaasnevad fenotüübilised muutused nende kahe suure populatsiooni vahel on sarnased, siis muutuste esinemissagedus on kõrgem $CD8^+$ T-rakkudes (Czesnikiewicz-Guzik jt, 2008). Antigeeniga kokku puutumata T-rakkude ehk naiivsete T-rakkude arvukus kahaneb nii $CD4^+$ kui $CD8^+$ populatsioonides, ent erinevus on eriti tähelepanuväärne $CD8^+$ T-rakkude puhul (Czesnikiewicz-Guzik jt, 2008). Erinevusi leiti ka $CD4^+$ ning $CD8^+$ T-mälurakkude alampopulatsioonide jaotust võrreldes: $CD4^+$ mälurakkude jaotus oli vanusega stabiilne, $CD8^+$

T-rakkudes märgati olulist tsentraalsete mälurakkude populatsiooni vähenemist ning perifeersete mälurakkude diferentseerumist T_{EMRA} rakkudeks (Joonis 2) (Czesnikiewicz-Guzik jt, 2008). Diferentseerunud $CD8^+$ T-mälurakkude kogunemist peetakse üheks põhjuseks, miks vanematel inimestel täheldatakse sageli $CD8^+$ T-rakkude osakaalu suurenemist võrreldes $CD4^+$ T-rakkudega (Wikby jt, 2008). Vähenenud $CD4^+/CD8^+$ suhet seostatakse suurenenud suremusega (Serrano-Villar jt, 2014).



Joonis 2. Vanuse mõju T-rakkude alampopulatsioonide jaotusele. Tulemused on näidatud noorte (n = 31, vanus 27,9 ± 5,5 aastat) ja vanade (n = 26, vanus 73,1 ± 4,2 aastat) inimestest verest eraldatud T-rakkude alampopulatsioonide jaotus. Naiivsete $CD4^+$ T-rakkude arvukuse vähenemine vanurites oli statistiliselt oluline (joonisel A), kuid $CD8^+$ naiivsete T-rakkude kaotus oli suurem (joonisel B). $CD4^+$ mälurakkude jaotuses vanusega olulisi muutusi ei tuvastatud, ent $CD8^+$ mälurakkude populatsioonis kahanes vanusega tsentraalsete mälurakkude osakaal ning suurenes diferentseerunud mälurakkude T_{EMRA}-de proportsioon. Joonisel kasutatud lühendid: CM (tsentraalsed mälurakud), EM (efektor-mälurakud). (Joonis ja allkiri modifitseeritud Czesnikiewicz-Guzik jt, 2008 põhjal).

1.3.1. Naiivsed T-rakud

Inimese esimestel eluaastatel on naiivsete T-rakkude genereerimisel oluline roll tüümusel. Alates puberteedieast hakkab tüümusekude kahanema (*thymus involution*) ning vananemisel naiivsete T-rakkude tootmine järk-järgult väheneb (Thapa ja Farber, 2019). Täiskasvanud inimeses moodustab T-rakkude proliferatsioon tüümuses alla 1% ja naiivsete rakkude populatsiooni säilitatakse peaaegu täies mahus perifeersete T-rakkude jagunemisega (Zhang jt, 2021). Naiivsed T-rakkudele omane pinnamarkerite profiil on $CD45RA^+CD28^+CD27^+$. CD28 ja CD27 on kostimulatoorsed molekulid, mis mängivad olulist rolli T-raku aktivatsioonil ja jagunemisel (Dolfi ja Katsikis, 2007). Naiivsed T-rakud ekspresseerivad tüüp 7 C-C motiiviga kemokiini retseptorit (CCR7) ja L-selektiini (SELL), mis on olulised sekundaarsetesse

lümfoidorganitesse nagu lümfisõlmedesse migreerumisel (Förster jt, 2008; Jameson ja Masopust, 2018). Naiivsed T-rakud suudavad sünteesida interleukiini IL-2, kuid tsütotoksilistele rakkudele omaste interferoon-gamma (IFN-γ), gransüüm B ja perforiini ekspressioon neis puudub (Xu ja Larbi, 2017).

Nagu eelnevalt mainitud, kahaneb vanusega eelkõige just $CD8^+$ naiivsete T-rakkude populatsioon. Üheks võimalikuks põhjuseks on naiivsetes $CD4^+$ T-rakkudes vanusega kõrgenev IL-2 retseptor α (IL2RA) ekspressioon, mille kaudu reguleerib tsütokiin IL-2 rakkude jagunemist. $CD8^+$ rakkudes aga retseptori ekspressiooni ajas suurenemist täheldatud ei ole (van der Geest jt, 2015). Kas ja milline mõju on kahanenud $CD8^+$ naiivsete rakkude populatsioonil vanemate inimese tervisele, on veel täpselt teadmata. Naiivsete rakkude väiksem hulk võib tähendada kehvemaid vastuseid uutele antigeenidele, mis oleksid olulised vanurites vaktsiinide tõhustamisel (Mittelbrunn ja Kroemer, 2021).

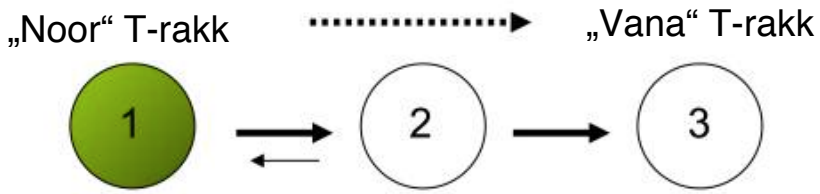
1.3.2. T-mälurakud

Kuivõrd naiivsed T-rakud on olulised antigeenidega esmases kokkupuutes, peab immuunsüsteem ka antigeenide informatsiooni talletama, et kaitsta hilisemate korduvate infektsioonide eest. Selles protsessis osalevad T-mälurakud, mis jaotatakse pinnamarkerite alusel tsentraalseteks (T_{CM}) ja efektor-T-mälurakkudeks (T_{EM}) (Jameson ja Masopust, 2018). T_{CM} rakud ekspresseerivad CCR7 retseptorit ja SELL-i, mis iseloomustab nende võimet migreeruda lümfisõlmedesse (Jameson ja Masopust, 2018; Sallusto jt, 1999). T_{EM} rakud on $CCR7^–$, L-selektiini ekspressioon varieerub ning erinevalt T_{CM} rakkudest on T_{EM} rakkudel efektorraku võimekus, sünteesides nii perforiini, IFN-γ, IL-4 kui IL-5 (Sallusto jt, 2004; van Lier jt, 2003). Nii T_{CM} kui T_{EM} rakud ekspresseerivad CD45RA asemel CD45RO isovormi (Xu ja Larbi, 2017). Sarnaselt naiivsetele rakkudele, sõltuvad ka mälu-T-rakud oma arvu ja repertuaari säilitamisel iseenda jagunemisest, sealjuures on üksikute mälu-T-rakkude eluiga lühem naiivsetest rakkudest (Borghans jt, 2018).

1.3.3. T_{EMRA} rakud

T_{EMRA} rakud on populatsioon terminaalselt diferentseerunud T_{EM} rakke, mis re-ekspresseerivad CD45RA retseptorit (Sallusto jt, 2004). CD45RA ekspresseerumist peeti esialgu ainult naiivsete T-rakkude markeriks (Akbar jt, 1988), kuid hiljem kirjeldati nii $CD4^+$ kui $CD8^+$ T-raku populatsioone, mis ekspresseerisid CD45RA retseptorit, kuid olid diferentseerunud rakule omaselt kaotanud CD28 ja CD27 ekspressiooni (Appay jt, 2008; Hamann jt, 1997; Libri jt, 2011). Suur osa T_{EMRA} rakkudest on fenotüübiliselt $CD28^–CD27^–$, kuid on leitud ka varieeruvama pinnamarkerite ekspressiooniga T_{EMRA} rakke (Salumets jt, 2022; Weng jt, 2009). $CD28^–$ T-rakud ei prolifereeru antigeeniga stimuleerimisel, samas on neil kõrgendatud

tsütotoksiline aktiivsus (Joonis 3) (Weng jt, 2009). Näiteks perforiini tootmine on T_{EMRA}-des T-mälurakkude populatsioonist suurim (Sallusto jt, 2004; Takata ja Takiguchi, 2006). Samuti on T_{EMRA} rakkudes suur hulk seriini proteaasi gransüüm B (GZMB), mis koostöös perforiiniga (PRF1) käivitavad märklaudrakus apoptoosi (Takata ja Takiguchi, 2006). T_{EMRA} rakkudes toodetakse kõrgemal määral IFN-γ, ent IL-2 tootmine on langenud võrreldes noortemate $CD8^+$ T-rakkudega (Appay jt, 2008). Ehkki T_{EMRA}-de tsütolüütiline aktiivsus on kõrge, on nende võimekus aktiveeruda TCR-MHC interaktsioonidega kahanenud (Geginat jt, 2003; Sallusto jt, 1999). T_{EMRA} rakkude madalat aktiveerumisvõimet on seostatud kõrgema suremusega, mida on omakorda seostatud madala antiapoptootilise valgu B-raku lümfoom 2 ekspressiooniga (*B-cell lymphoma 2*, BCL-2) (Geginat jt, 2003).



Pinnamarker:			
CD45RA	+++	-	+++
CD28	+++	-	-
CD27	+++	+	-
Funktsionaalsed muutused			
Retseptorite mitmekesisus	+++	++	+
Prolifereerumisvõime:			
Antigeen	+++	+	-/+
Tsütokiin	+++	++	++
Tsütotoksiline funktsioon	-	+	++

Joonis 3. „Noore“ ja „vana“ $CD8^+$ T-raku võrdlus. Joonis iseloomustab T-rakkude, sh T_{EMRA}-de järk-järgult diferentseerumist vananenud T-rakuks. Pinnaretseptoritest ekspresseerivad vananenud T-rakud taas CD45RA nagu noored T-rakudki, ent CD28 ja CD27 ekspressioon on vanades rakkudes kadunud. Antigeeniga kokkupuude ei stimuleeri vanasid T-rakke jagunema, jagunemist võivad stimuleerida teatud tsütokiinid, kuid ka tsütokiinide puhul on vananenud rakkude aktivatsioonilävi kõrgem kui noortes T-rakkudes. Tsütotoksiline funktsioon on aga hiliselt diferentseerunud $CD8^+$ T-rakkudes isegi suurem kui jagunemisvõimelistes diferentseerunud T-rakkudes. (Joonis ja allkiri kohandatud Weng jt, 2009 põhjal)

Kuna T_{EMRA}-de immunoloogiline funktsioon antigeeni äratundmisel aktiveeruda on puudulik, nimetatakse kirjanduses T_{EMRA} rakke tihti vananenud (*senescent*) rakkudeks (Goronzy ja Weyand, 2019; Pawelec, 2018). Tõepoolest, vananenud rakkudele omaseid tunnuseid on T_{EMRA}-del veel: lühenenud telomeerid (Akbar jt, 2004; Romero jt, 2007), defektsed

mitokondrid (Callender jt, 2020) ja SASP ekspressioon (Callender jt, 2018). SASP-i tutvustati töö esimeses peatükis kui immunomoduleerivatest ainetest ja kasvufaktoritest koosnevat sekretoorset profiili. Pikemaajaline SASP püsimine võib tekitada kroonilist põletikku, põhjustada või süvendada olemasolevaid haigusi (Goronzy ja Weyand, 2019). T_{EMRA} rakkude SASP koosneb põhiliselt proteaasidest, interleukiinidest ja kemokiinidest, muuhulgas on eriti üles reguleeritud kasvaja nekroosifaktor-alfa (TNF-α), interleukiinid IL-18 ja IL-29 ning C-C motiiviga kemokiini ligandid CCL5 ja CCL16 (Callender jt, 2018). Täielikult vananenud rakkudeks T_{EMRA}-sid pidada ei saa, kuna nende rakutsüklit on võimalik spetsiifiliste protokollidega taas käivitada (Di Mitri jt, 2011; Waller jt, 2007).

T_{EMRA} rakkudele on omane ka loomulike tappurrakkude ehk NK-rakkude (*natural killer cell*) retseptorite ekspressioon (Pereira jt, 2020; Tarazona jt, 2000). NK-rakkude lektiini-sarnaste retseptorite (KLR, *killer cell lectin-like receptor*) hulgast ekspresseerivad $CD8^+$ T_{EMRA} rakud KLRG1, mis viitab väiksele proliferatiivsele võimele (Ibegbu jt, 2005). T_{EMRA} rakkudes on samast retseptorite perekonnast ülesreguleeritud KLRD1 ja KLRF1, mis viitavad kõrgenenud tsütotoksilisusele (Godlove jt, 2007). Kõrgenenud tsütotoksilisust $CD8^+$ T_{EMRA} rakkudes näitab ka lümfotsüütilist aktivatsiooni signaleerivate molekulide (SLAM) perekonnast ülesreguleeritud SLAMF4 (Godlove jt, 2007). Põhjuseid, miks kõrgelt diferentseerunud T-rakud nagu T_{EMRA}-d NK-retseptoreid ekspresseerivad on välja pakutud mitmeid. Kuna T_{EMRA} rakud on eriti prominentsed vanemates inimestes, on pakutud, et NK-retseptorite ekspressioon on vanema organismi kõrgenenud põletikulise seisundi tagajärg (Fann jt, 2005). Samuti on teooria, et hilises diferentseerumisstaadiumis $CD8^+$ T-rakud kompenseerivad NK-retseptorite ekspresseerimisega TCR repertuaari kahanemisest tingitud kehvemat immuunkaitset (Abedin jt, 2005). TCR repertuaari kahanemisest räägitakse lähemalt järgmises lõigus.

Ehkki T_{EMRA} rakke leidub nii $CD4^+$ kui $CD8^+$ rakkude hulgas, kumuleerub $CD8^+$ T_{EMRA} rakke rohkem (Czesnikiewicz-Guzik jt, 2008). T_{EMRA} rakud kuhjuvad organismis nii vanusega kui ka krooniliste viirusnakkustega nagu tsütomegaloviirus (CMV) ja vähesemal määral ka Epstein-Barri viirusega (EBV) (Dunne jt, 2002; Wertheimer jt, 2014). Viirusnakkused on üks peamine T_{EMRA} rakkude tekitaja; arvatakse, et pärast viraalset infektsiooni on aktiveeritud T-rakkude eemaldamine häiritud, kuid täpne põhjus on veel selgitamisel (Goronzy ja Weyand, 2019; Wertheimer jt, 2014). Erinevatest T-raku alampopulatsioonidest on T_{EMRA}-de TCR mitmekesisuse vähenemine kõige tähelepanuväärsem, osaliselt just nende tendentsist viirusnakkuste järel kuhjuda (Pangrazzi ja Weinberger, 2020). Kuigi TCR repertuaari kahanemist vanusega on märgatud ka näiteks naiivsetes T-rakkudes, on senised uuringud näidanud, et selle mõju immuunvastuse efektiivsusele on võrdlemisi tühine või ebaselge

(Goronzy ja Weyand, 2019; Mittelbrunn ja Kroemer, 2021). T_{EMRA} rakke seostatakse aga nn mälu inflatsiooniga, fenomen, kus T-mälurakkude hulgas domineerib üks kloon sama antigeeni spetsiifikaga T-mälurakke (Klenerman, 2018). CMV on üks viirustest, mille suuri kloone on T_{EMRA} populatsioonis märgatud. On pakutud, et suurenenud CMV-spetsiifilised T-raku kloonid võivad negatiivselt mõjutada immuunvastust teistele antigeenidele, kuid uuringud sellel teemal alles käivad (Lanfermeijer jt, 2020). Üleüldist (mitte ainult CMV-spetsiifiliste) T_{EMRA} rakkude kuhjumist on seostatud nii reumatoidartriidiga (Martens jt, 1997), südamehaigustega (Liuzzo jt, 2000; Spyridopoulos jt, 2016) kui ka kehvema vaktsineerimisedukusega vanurites (Goronzy jt, 2001). Samas on leitud, et 85a ja vanemates inimestes korreleerub T_{EMRA} rakkude suur hulk pikema elueaga (Derhovanessian jt, 2013). T_{EMRA} rakkude mõju vananenud immuunsusele on veel ebaselge ning täpsemate teadmiste nimel töö veel käib. Võimalik, et T_{EMRA} rakkude kuhjumisel on nii positiivseid kui negatiivseid efekte, mispuhul oleks huvitav teada, kuidas soosida esimesi ja vähendada viimaseid.

1.4. Tsütomegaloviirus

Tsütomegaloviirus (CMV) on β-herpesviirus, mis püsib kehas latentsena terve elu, reaktiveerudes aeg-ajalt (Cannon jt, 2010). CMV nakkus on võrdlemisi levinud ning selle esinemistihedus kasvab vanusega: Hollandis tehtud uuringus oli globaalsest läänest pärit inimeste CMV seropositiivsuse osakaal 51,3% vanusevahemikus 50-59 ning 65,6% vanusevahemikus 75-79 (Korndewal jt, 2015). Immunokompetentsetes inimestes CMV nakkus tüüpiliselt sümptomeid ei tekita, kuid nõrgendatud immuunsusega inimestes on CMV seropositiivsus seotud kõrgema suremusega (Reeves ja Sinclair, 2008). Näiteks on CMV nakkus ohtlik organisiirdamise patsientidele, kellele manustatakse immunosupressiivseid ravimeid, ja ka AIDS-i põdevatele inimestele (Sissons ja Wills, 2015).

1.4.1. CMV-spetsiifilised T-rakud

CMV nakkus kutsub esile T-rakulist immuunvastust, mis pärast esmast nakkust ei kontraheeru. Tüüpiliselt suunduvad enamik infektsiooni ajal aktiveeritud T-rakke pärast infektsiooni lahenemist apoptoosi, ent CMV-spetsiifilised T-rakud püsivad kaua aega organismi T-mälurakkude populatsioonis (Holtappels jt, 2000). CMV-seropositiivsetel indiviididel moodustavad CMV-spetsiifilised T-mälurakud keskmiselt 10% kõigist T-mälurakkudest ja seda nii $CD4^+$ kui $CD8^+$ populatsioonides (Sylwester jt, 2005). Sealjuures on CMV-seropositiivsetes vanurites CMV-spetsiifilisi T-rakke rohkem kui CMV-seropositiivsetes noortes inimestes (Griffiths jt, 2013). Samuti on leitud, et CMV-seropositiivsete inimeste T-mälurakud on rohkem diferentseerunud kui CMV-seronegatiivsetel inimestel, CMV nakkus justkui „vanandab“ organismi T-mälurakke (Litjens jt, 2011; Northfield jt, 2005).

Suur osa CMV-spetsiifilistest T-rakkudest on nii $CD4^+$ kui $CD8^+$ rakkude puhul fenotüübiliselt T_{EMRA} rakud (Chidrawar jt, 2009; Derhovanessian jt, 2011; Strindhall jt, 2013). Sellele viitab nende $CD45RA^+CD28^-CD27^-$ fenotüüp (Appay jt, 2002; Derhovanessian jt, 2011). Sealjuures on CMV-spetsiifilised T-rakud vahetult pärast infektsiooni tüüpiliselt $CD45RO^+CD28^-CD27^+$, CD27 ekspressiooni kadumine ja CD45RA re-ekspressioon toimub pärast infektsiooni lahenemist kui viirus muutub latentseks (Pipeling jt, 2008; Wills jt, 2002). CMV-spetsiifilised T-rakud on enamjaolt $CCR7^-SELL^-$, mis viitab nende perifeersele paiknemisele kehas (van den Berg jt, 2019)

Mitmete latentsete viiruste nagu EBV ja HIV puhul ekspresseerivad tekkinud viirusspetsiifilised $CD8^+$ T-rakud kurnatud (*exhausted*) rakkudele omaseid inhibitoorseid retseptoreid, näiteks programmeeritud rakusurma valku 1 (PD-1) (Blackburn jt, 2009; Sauce jt, 2007). CMV-spetsiifilised T-rakud aga ekspresseerivaid selliseid retseptoreid vähe ning nad on veel funktsionaalsed tsütotoksilised rakud (Hertoghs jt, 2010; Sauce jt, 2007). CMV-spetsiifiliste $CD8^+$ T-rakkude tsütotoksilist aktiivsust näitab ka nende eomesodermiini (EOMES) ja t-järjestuse valgu (T-bet) ekspressioon: transkriptsioonifaktorid, mis reguleerivad IFN-γ, gransüüm B ja perforiini tootmist $CD8^+$ T-rakkudes (Hertoghs jt, 2010; Pearce jt, 2003). Nimetatud tsütotoksiliste molekulide ekspressiooni on samuti CMV-spetsiifilistes $CD8^+$ T-rakkudes täheldatud (Hertoghs jt, 2010). CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud ekspresseerivad ka NK-rakkudele omaseid retseptoreid nagu KLRG1 ja SLAMF4 (Hertoghs et al., 2010).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

1) mõõta 65-aastaste ja vanemate inimeste $CD8^+$ naiivsetes T-rakkudes, $CD8^+$ T-mälurakkudes, $CD8^+$ T_{EMRA} rakkudes ja $CD8^+$ CMV-spetsiifilistes T-rakkudes tsütotoksilisuse, raku diferentseerumise ja aktiveerumisvõimega seonduvate geenide ekspressiooni.
2) võrrelda geenisekspressiooni tasemeid rakutüüpide kaupa ja kirjeldada erinevusi $CD8^+$ T_{EMRA} ja $CD8^+$ CMV-spetsiifiliste T-rakkude geenisekspressioonis võrreldes $CD8^+$ naiivsete T-rakkude ja $CD8^+$ T-mälurakkudega.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Valimi kirjeldus

Töös uuriti kümmet patsienti Tartu Ülikooli Kliinikumi Sisekliinikust ja Nahahaiguste kliinikust vanusevahemikus 66-90 (Tabel 1). Patsientidelt koguti 2017. ja 2018. aasta jooksul vereproovid, millest eraldati perifeersed mononukleaarsed vererakud teiste töögrupi liikmete poolt ja säilitati edasisteks uurimusteks -150°C juures. Materjali kogumine ja säilitamine oli kooskõlastatud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komiteega (load 272/T-12, 275/M-17 ja 362/M-6).

Tabel 1. Valimisse kaasatud indiviidide sooline jaotus ja keskmine vanus

Asutus	**Patsientide jaotus**		**Keskmine vanus aastates**
Sisekliinik	*n* = 9		76,1 ± 7,6
	mehed	naised	
	2	7	
Nahahaiguste kliinik	*n* = 1		73
	mehed	naised	
	1	0	

2.2.2. Rakkude stimulatsioon ja sortimine

Rakkude stimuleerimist ja sortimist tegi teine töögrupi liige. Rakkude stimuleerimine oli vajalik CMV-spetsiifiliste $CD8^+$ T-rakkude aktiveerimiseks. Eelnevalt eraldatud rakud sulatati veevannis ning loendati. Seejärel stimuleeriti rakke CMV peptiidiseguga, mis sisaldas iga

miljoni raku kohta 2 µl *PepTivator CMV pp65* (Miltenyi Biotec, kataloginumber 130-093-438), 1 µl anti-CD40 antikehasid (100 µg/ml, Miltenyi Biotec, kataloginr 130-094-133) ja 3 µl kostimulantide segu. Kostimulantide segu koosnes X-Vivo-15 söötmest (Lonza, söötmele oli eraldi lisatud penitsilliini, streptomütsiini ja L-glutamiini), anti-CD28 antikehadest (1 mg/ml, BD Biosciences, kataloginr 555725) ja anti-CD49 antikehadest (1 mg/ml, BioLegend, kataloginr 304340), vastavalt 8:1:1 vahemikus. Negatiivseks kontrolliks lisati rakkudele 3 µl kostimulantide segu ja 1 µl anti-CD40 antikehasid (100 µg/ml, Miltenyi Biotec, kataloginr 130-094-133). Rakke hoiti üleöö 37°C juures CO_2 inkubaatoris.

Järgnevalt võeti rakud üles 1 ml 2mM EDTA-PBS puhvris (Lonza) ja hoiti inkubaatoris 37°C juures 10 minutit. Katsuteid segati aeglaselt vorteksil ja tõsteti ümber 1,5 ml mahuga Eppendorfi katsutitesse. Seejärel tsentrifuugiti rakke 4°C juures raskuskiirendusel 400g 5 minutit (Eppendorf 5810R, rootori tüüp A-4-62). Supernatandi eemaldamisel allesjäänud sademele lisati 25 µl FcR blokaatori lahust, et inhibeerida mittespetsiifilisi antikehade seondumisi. FcR blokaatori lahus koosnes 5 µl FcR blokaatorist (Miltenyi Biotec) ja voolutuspuhvrist. Voolutuspuhver koosnes 9:1:0,4 vahekorras PBS-ist (Lonza), 5% veise seerumi albumiinist BSA (Akron Biotechnology) ja EDTA-st (Lonza). Katsutitesse lisati 25 µl antikehade segu (koostist vt Tabel 2). Rakkude ja antikehade lahuseid inkubeeriti 4°C 30 minutit, pesti voolutuspuhvriga ja võeti samas puhvris üles (200 µl 1 miljoni raku kohta). Rakkude sortimiseks kasutati voolutsütomeetrit Sony MA900. CD3 koretseptori alusel sorditi välja elusad T-rakud, seejärel sorditi välja nii $CD8^+$ kui $CD4^+$ T-rakud. $CD8^+$ T-rakkude hulgast sorditi CD137 ja CD154 valkude alusel välja CMV-spetsiiflised $CD8^+$ T-rakud. Mitte CMV-spetsiifilistest $CD8^+$ T-rakkudest sorditi CCR7 ja CD45RA spetsiifiliste antikehadega välja naiivsed $CD8^+$ T-rakud ($CCR7^+CD45RA^+$), $CD8^+$ T-mälurakud ($CCR7^{+/-}CD45RA^-$) ja $CD8^+$ T_{EMRA} rakud ($CCR7^-CD45RA^+$). Voolutsütomeetrilise rakusortimise tulemuste graafiku leiab Lisast 1. Rakud sorditi katsutitesse, kus oli üleöö hoitud 4% BSA lahust (Akron Biotechnology), et rakud ei kleepuks katsuti seintele. Edasisteks RNA töödeks säilitati rakud 500 µl QIAzolis (Qiagen).

Tabel 2. Rakkude sortimiseks kasutatud antikehade segu, valmistatud varuga

Antikeha spetsiifika	Tootja, kataloginr	Fluorestsents-marker	Lõppkontsentratsioon	Ruumala ühe proovi kohta (µl)
CD154	BioLegend, 310824	BV421	7,34 µg/ml	2
CD137	Miltenyi Biotec, 130-110-763	PE	1:50	2
CD3	BioLegend, 300415	AF488	3,67 µg/ml	0,5

CD4 (1:10 lahjendus)	BioLegend, 317427	AF700	9,17 µg/ml	5
CD8	BioLegend, 301040	BV605	0,33 µg/ml	0,75
CD45RA (1:10 lahjendus)	BioLegend, 304125	PE-Cy7	0,37 µg/ml	2
CCR7	BioLegend, 353236	PE-Dazzle	11 µg/ml	2
voolutuspuhver			~1:1	13
KOKKU				27,25

2.2.3. RNA eraldamine

Sorditud rakkudest eraldati RNA kasutades kommertsiaalset komplekti RNeasy Micro (Qiagen). 500 µl QIAzolis (Qiagen) säilitatud rakusade sulatati toatemperatuuril, suspendeeriti ning lisati veel 500 µl QIAzoli lüüsireagenti. Pärast 5-minutilist toatemp. inkubatsiooni pipeteeriti katsutisse 1 ml QIAzoli kohta 200 µl kloroformi, segati vorteksil ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Faaside eraldamiseks tsentrifuugiti katsuteid 15 minutit 4°C tsentrifuugis 12000 rpm juures (Eppendorf 5415R, rootori tüüp F-45-24-11; kõikideks järgnevateks tsentrifuugimisetappideks kasutati sama masinat ja rootorit). Eraldunud vesifaas tõsteti uude katsutisse ja sellele lisati võrdne ruumala 70% etanooli lahust. Saadud segu tõsteti komplektiga kaasa tulnud kolonnile ja tsentrifuugiti 15 sekundit toatemperatuuril 13000 rpm juures. Seejärel pesti kolonni 350 µl komplektiga kaasa tulnud lahusega RW1 ning tsentrifuugiti taas 15 sekundit toatemperatuuril 13000 rpm juures. Kolonnile lisati 80 µl DNaasi ja RDD puhvri segu (mõlemad Qiagen, segu vahekorras 1:7). Kolonniga katsutit inkubeeriti toatemperatuuril 20 minutit ja pesti uuesti 350 µl RW1 puhvriga. Kolonni tsentrifuugiti 15 sekundit toatemperatuuril 13000 rpm, läbijooks visati koos katsutiga minema. Kolonn asetati uude katsutisse ja sellele pipeteeriti 500 µl komplektiga kaasa tulnud RPE puhvrit, taaskord tsentrifuugiti 15 sekundit toatemp. 13000 rpm. Seejärel pesti kolonni 500 µl 80% etanooliga ja tsentrifuugiti 2 minutit toatemperatuuril 13000 rpm. Läbijooks visati koos katsutiga ära ning kolonn pandi uude katsutisse. Katsuteid tsentrifuugiti lahtiste kaantega 5 minutit toatemperatuuril 13000 rpm. Kolonn asetati uude märgistatud katsutisse, sellele lisati 14 µl ja tsentrifuugiti 1 minut toatemperatuuril 13000 rpm. Pärast eraldamist mõõdeti RNA kontsentratsiooni spektrofotomeetriga NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) ja hinnati kvaliteeti RIN-numbriga, kasutades 2100 Bioanalyzer elektroforeesi instrumenti ning RNA 6000 Pico komplekti (Agilent). Eraldatud RNA-d säilitati -80°C juures.

2.2.4. cDNA süntees

Töös kasutatud proovid olid algmaterjaliks ka teise töögrupi liikme eksperimentidele, mistõttu mõõdeti proovid alles jäänud koguse määramiseks manuaalselt pipetiga üle. Reaktsiooniks võeti 11 µl RNA-d (RNA kogus vahemikus 15-1000 ng), millele lisati 1 µl 10mM dNTP segu (Fermentas), 1 µl 500µg/ml oligo$(dT)_{20}$ praimerit (Invitrogen) ning proovi inkubeeriti 65°C juures 5 minutit. Inkubeerimise lõppedes tõsteti proovid kohe jääle, kus neid hoiti vähemalt minut aega. Pöördtranskriptsiooni etapiks valmistati ensüümisegu: 4 µl 5x First Strand puhvrit (Invitrogen), 1 µl 0,1M DTT (Invitrogen), 1 µl 200U/µl *SuperScript III* revertaasi (Invitrogen) ja 1 µl 40U/µl *RiboLock* RNaaside inhibiitorit (Fermentas). Segu lisati praimeritega seondunud proovile ja inkubeeriti 50°C juures tund aega. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni peatamiseks kuumutati proovid 70°C-ni ja inkubeeriti 15 minutit. cDNA tsentrifuugiti põhja ja ruumala viidi 40 µl-ni lisades 20 µl MQ vett. cDNA proove säilitati -20°C juures.

2.2.5. Uuritavad geenid ja kasutatud ekspressioonipraimerid

Antud töös uuriti rakkudes 29 erineva geeni ekspressiooni. Geenid valiti töösse kirjanduse põhjal, samuti mõjutas valikut töögrupis varem läbi viidud, kuid töö esitamise ajaks avaldamata mikrokiibi geenieksprессiooni analüüsid. Eelkõige valiti välja just sellised geenid, mille üles- või allareguleeritust on täheldatud just T_{EMRA} rakkudes. Funktsionaalsete klastritena joonistuvad välja NK-rakkude retseptorite grupp, tsütotoksilisust reguleerivad geenid, tsütokiinid ja tsütokiinide retseptorid, kostimulatoorsed molekulid ja transkriptsioonifaktorid (Tabel 3).

Ekspressioonipraimerid disainiti kasutades programmi Primer-BLAST (Ye jt, 2012). Uuritud 29 geenist valmistati praimerid 19 geenile, ülejäänud olid eelnevalt disainitud teiste töögrupi liikmete poolt. Kasutatud koduhoidja *β2M* geeni ekspressioonipraimerid olid samuti juba eelnevalt disainitud. Praimerid telliti firmast Metabion. Disainimisel kasutati järgnevaid sätteid:

- amplikoni pikkus vahemikus 70-150 bp
- praimeri sulamistemperatuur T_m vahemikus 59°C-64°C, optimum 62°C
- vähemalt üks praimer praimeripaarist peab hõlmama eksonite ühenduskohta
- praimeripaari vahel peab (genoomses DNA-s) olema vähemalt üks intron

Tabel 3. Töös uuritud geenid ja vastavad ekspressioonipraimerite järjestused. Praimerid geenidele, mis disainiti töö autori poolt on märgitud halli taustaga.

Funktsionaalne grupp	**Geen**	**Päripidine (*forward*) praimer**	**Äraspidine (*reverse*) praimer**
Koduhoidja	*β2M*	TGCTCGCGCTACTCTCTCT	TCCATTCTCTGCTGGATGAC

Tsütotoksilisuse geenid	*GNLY*	GAGGGCCCCCAGGGTGA	ACAGGACAAGGTGAGAGGGC
	GZMB	GCGAATCTGACTTACGCCATTA	CCAGAGTCCCCCTTAAAGGAA
	GZMH	TGGCGGCATCCTAGTGAGAA	GCCCCCAAGGTGACATTTATG
	PRF1	CAGGAGCCTCGGTGAAGAGAG	CAGGAGCCTCGGTGAAGAGAG
NK-rakkude retseptorid	*KLRD1*	GCTCAGCTTCAACAATTCAACGC	CACAGAGTGGTCTTAAACACTGCC
	KLRF1	AGGAGTTCTGCCCAAACATCTCA	TACTCCCTGAGAAACCAACAGG
	KLRG1	GCCCAGAATGACTATGGACCAC	GAGTAGTTGGAGCCCTGGCA
	NKG7	GGACATCATATCAGGCCACGG	GTCTGGATCTGGGGGTGTGG
	SLAMF4	CCAGGAGAAATCACGAGCAGGA	TGTGACGTGGGAGCAGAAGA
	SLAMF6	GCAGAGTCCGCAAGGAACCTA	GTGTCCAGATTTCTGTTTCCCTGT
Tsütokiinid ja tsütokiinide retseptorid	*IFNG*	GCTCGTCTCCATTTACAAAAACTGA	GGAAAAATTGGACCACCTAAACTG
	IFNGR2	TTCAGCAGCTACTCATGACCC	CTCAGGACCTGCTCTGCGTT
	IL2	TCAAACCTCTGGAGGAAGTG	GTTGTTTCAGATCCCTTTAGTTC
	IL2RA	GGCTCTACACAGAGGTCCTGC	CTGAGGCTTCTCTTCACCTGGA
	CCR4	CCTGAGCCAGTGTCAGGAGG	TCAGCCCAGGTGAACCCTTG
	CCR7	CTTGTCATTTTCCAGGTATGCC	GGAGCACAAAGACTCGAACA
	XCL1	CAGCAGGACCTCAGCCATGA	TCACTCCCTACACCTTCCACA
Kostimulatoorsed molekulid	*CD27*	GGCCACCCCAAAGATCCC	TCGTTGATGGAGGAACAGGG
	CD28	CCGGACCTTCTAAGCCCTTT	TCCTCTTACTCCTCACCCAGA
	ICOS	TGTTGCCAGCTGAAGTTCTGG	GTGCACACTGGATGAATACTTCTTT
Transkriptsiooni-faktorid	*EOMES*	GGGATCTTGCGGAGGACTGG	AAAGGAAACATGCGCCTGCC
	EGR2	GCCGGAGATGGCATGAT	TTCTAGGTGCAGAGACGGGA
	RUNX3	CCACAAGCCACTTCAGCAG	GAAGGAGCGGTCAAACTGG
Muu	*BACH2*	AATCCGCAAATTGGTGTGTGA	ACTTCCTGGGAAAGGCAGGA
	BCL2	GGATAACGGAGGCTGGGATGC	GGGCCAAACTGAGCAGAGTC
	BCL2L1	CCTAAGGCGGATTTGAATCTCTTTC	ATGGGCTCAACCAGTCCATTGT
	CD45	GCATGGTTTCCACATTCGAGC	TTCTGAGCAGGGTAGGTGCTG
	NELL2	CGGCTCTTGCGTATGTGGATG	TCATGGTCTGGTCCTTGCACT
	SELL	AGTCATGGTTACTGCATTCTC	GGGTCATTCATACTTCTCTTGG

2.2.6. Reaalaja-PCR

Reaalaja-PCR läbiviimiseks kasutati *ViiA 7 Real-Time PCR System* masinat (Thermo Fisher Scientific). Kõikide inimeste jaoks tehti üks katse. Ühe proovi kohta valmistati reaktsioonisegu järgnevas vahekorras: 14,5 µl MQ, 16,3 µl *2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*

(Fermentas) 1 µl 5mM uuritava geeni päri- ja äraspidiste (*forward* + *reverse*) praimerite segu ja 1 µl cDNA-d. Proovid pipeteeriti manuaalselt 384-kaevulisele mikrotiiterplaadile kolmes korduses. Negatiivse kontrollina kasutati MQ-d. Reaalaja-PCR-i programmietapid olid järgnevad: esmane denatureerimine ja polümeraasi aktivatsioon 95°C juures 10 minutit, millele järgnes 45 tsüklit PCR reaktsiooni. PCR reaktsiooni etappideks olid denaturatsioon (95°C 15 sekundit), praimerid seondusid ja produkti pikendati samal temperatuuril (60°C 1 minut).

2.2.7. Andmeanalüüs

Geenieksрessiooni andmete analüüsimiseks kasutati $2^{-\Delta\Delta CT}$ meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001), sealjuures normaliseeriti kõik tulemused koduhoidja geeni *β2M* (beeta-2-mikroglobuliin) ekspressiooni suhtes ja referentsgrupina kasutati naiivsete T-rakkude populatsiooni. Statistilise analüüsi hõlbustamiseks ja paremaks visualiseerimiseks logaritmiti saadud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtused. Statistilisel analüüsil kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallise testi, millele järgnes Dunn test paarikaupa võrdlusteks. Statistiliselt oluliseks loeti tulemusi, mille $p < 0,05$. Andmed korrastati esmalt Microsoft Excelis, statistiliseks analüüsiks ja graafikute koostamiseks kasutati tarkvara GraphPad Prism 9 (versioon 9.3.1, GraphPad Software Inc, USA). Graafikutel on tulemused märgitud mediaanide ja 95% usalduspiiridega, samuti tähistati horisontaalsete joonte ja vastava p-väärtusega kõik statistiliselt olulised paarikaupa võrdlused.

2.3. Tulemused

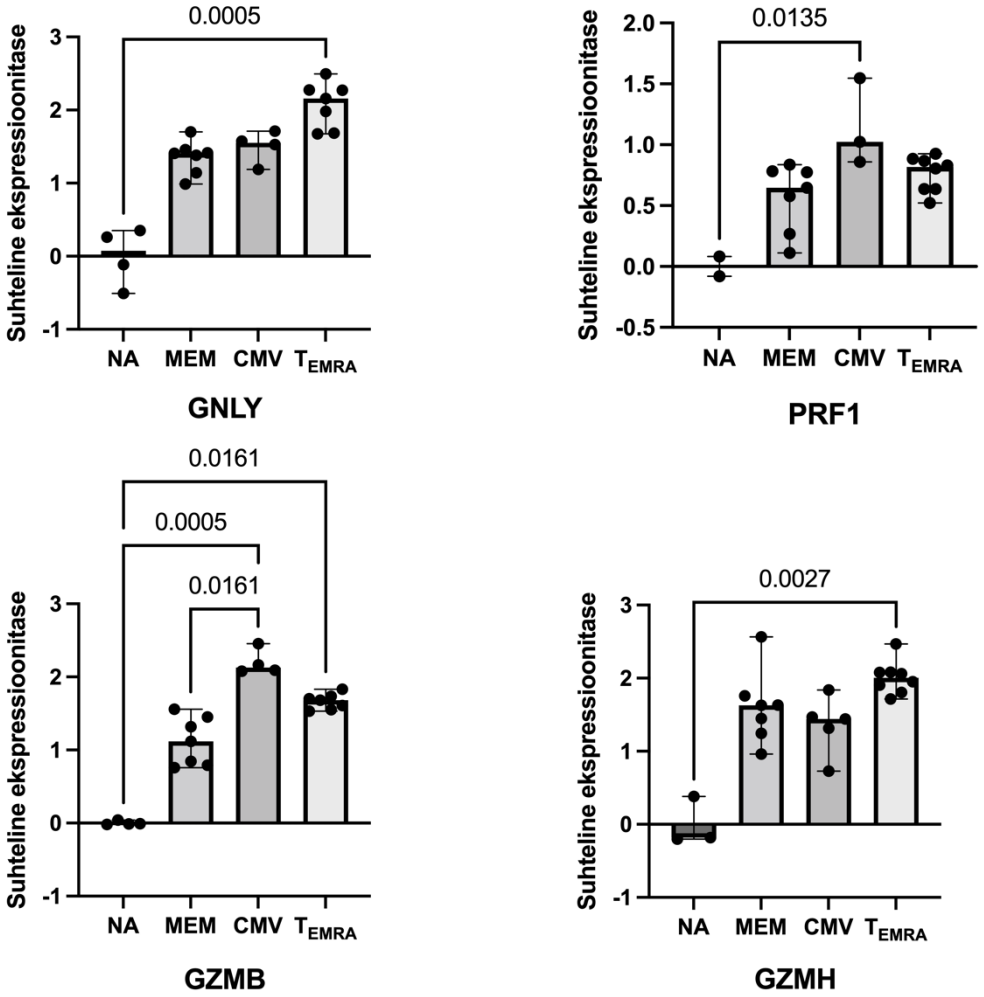
Käesolevas töös mõõdeti 29 geeni ekspressioonitaset 65-aastaste ja vanemate inimeste $CD8^+$ naiivsetes, mälu- ja CMV-spetsiifilistes T-rakkudes ja $CD8^+$ T_{EMRA} rakkudes. Rakupopulatsioonid on joonistel tähistatud vastavalt NA, MEM, CMV ja T_{EMRA}. Töös analüüsiti 10 inimese proove. Uuritud geenide tabel on leitav peatükist „Uuritavad geenid ja kasutatud ekspressioonipraimerid“ (lk 21, Tabel 3). Tulemustesse ei ole kaasatud *CCR4,* interferoon-γ retseptori *IFNGR2*, *IL2* ja interleukiin-2 retseptori *IL2RA* geene, kuna nende ekspressiooni mõõtmised andsid ebausaldusväärseid tulemusi. Kõik tulemused on normaliseeritud koduhoidja geeni *β2M* ekspressiooni suhtes ning analüüsitud naiivsete $CD8^+$ T-rakkude suhtes.

2.3.1. Tsütotoksilisuse geenide ekspressioon

Tsütotoksilisuse markerite (*GNLY*, *GZMH*, *GZMB*, *PRF1*) geenieksрessioon erines rakutüüpide vahel (Joonis 4). Granlüsiini (*GNLY*) sünteesimine oli oluliselt kõrgem T_{EMRA} rakkudes, ligikaudu 120 korda kõrgem ekspressioonitase võrreldes naiivsete T-rakkudega ($p = 0,0005$). T-mälurakkude populatsiooni ekspressioonitase oli 20 korda ja CMV-spetsiifiliste rakkude ekspressioonitase 30 korda kõrgem naiivsetest T-rakkudest, kuid erinevused ei

osutunud statistiliselt oluliseks. Perforiini (*PRF1*) ekspressioonitase oli kõrgeim CMV-spetsiifilistes rakkudes, olles 10 korda ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega ($p = 0,0135$). T_{EMRA} ja T-mälurakkude puhul statistiliselt olulisi erinevusi *PRF1* ekspressioonis ei esinenud.

Gransüümide hulgast ekspresseerisid *GZMB* kõige rohkem CMV-spetsiifilised rakud: võrreldes naiivsete T-rakkudega oli *GZMB* 138-kordselt ülesreguleeritud ($p = 0,0005$). Samuti tuvastati statistiliselt oluline erinevus T-mälurakkude ja CMV-spetsiifiliste rakkude *GZMB* ekspressioonis, CMV-spetsiifilised rakud ekspresseerisid *GZMB* geeni 10 korda kõrgemal tasemel kui T-mälurakud ($p = 0,0161$). T_{EMRA} rakkudes oli *GZMB* ekspressioon 49 korda kõrgem võrreldes naiivsete T-rakkudega ($p = 0,0161$). *GZMH* ekspressioonis esines statistiliselt oluline erinevus ($p = 0,0027$) naiivsete T-rakkude ja T_{EMRA} rakkude vahel, T_{EMRA} rakkudes oli *GZMH* 155 korda ülesreguleeritud. Ehkki geeni ülesreguleerimist võrreldes naiivsete rakkudega oli märgata ka T-mälurakkude ja CMV-spetsiifiliste rakkude populatsioonides, ei osutunud need erinevused statistiliselt oluliseks.

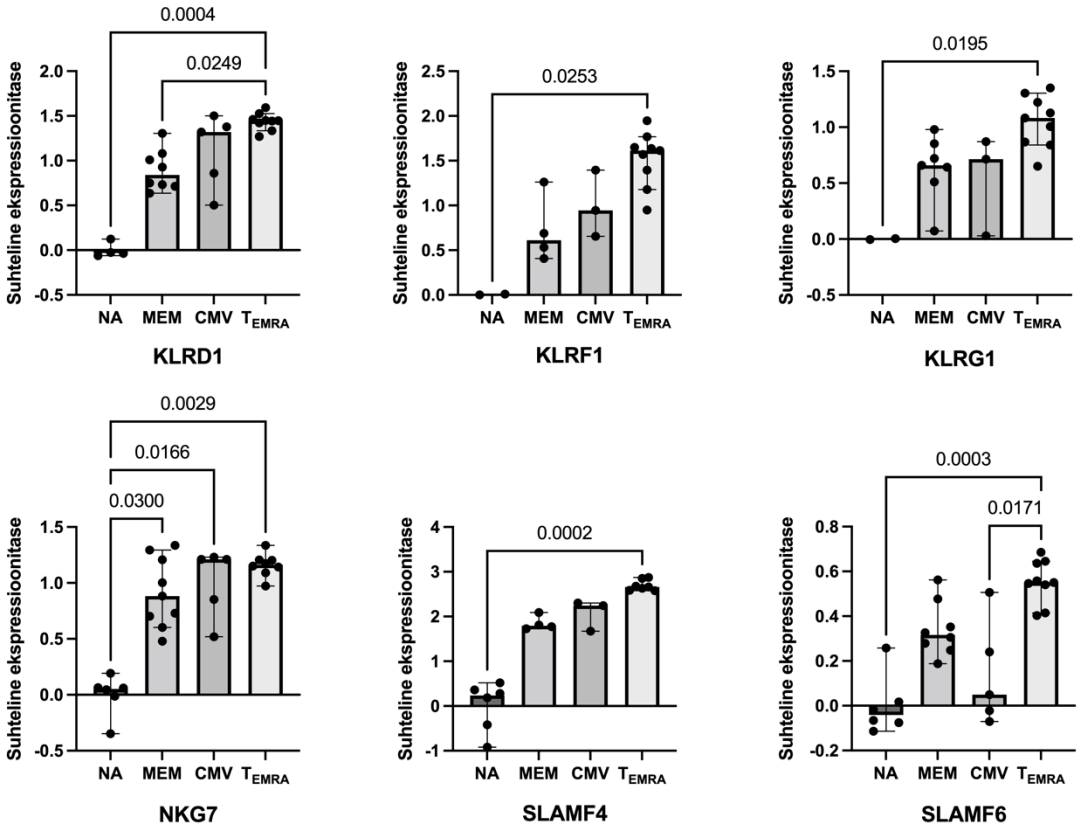


Joonis 4. Tsütotoksilisuse markerite rühma suhteline geenieksprессiooni tase erinevates CD8$^+$ T-rakkudes. Joonisel kasutatud lühendid: NA (naiivsed CD8$^+$ T-rakud), MEM (CD8$^+$ T-mälurakud), CMV (CMV-spetsiifilised CD8$^+$ T-rakud). Suhteline ekspressiooni tase on esitatud logaritmitud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusena. Tulp joonisel tähistab ekspressioonitaseme mediaani ning see on koos 95% usalduspiiridega. Graafikutele on märgitud ka statistiliselt olulised p-väärtused gruppide vahel. Kõik tulemused on esitatud naiivsete CD8$^+$ T-rakkude vastava geeni ekspressiooni suhtes. Graafikutelt on näha, et *GNLY* ekspressioon oli kõrgeim T_{EMRA} rakkudes ja ligilähedane MEM ning CMV rakkudes. *PRF1* ekspressioon oli kõrgeim CMV rakkudes. *GZMB* ekspressioon oli samuti kõrgeim CMV rakkudes, statistiliselt oluline erinevus oli ka NA ja T_{EMRA} rakkude vahel. *GZMH* ekspresseeriti kõige rohkem TEMRA rakkudes.

2.3.2. NK-rakkudele omaste retseptorite ekspressioon

NK-rakkudele omaste retseptorite geenieksprессioonide tasemed varieerusid T-raku tüüpide vahel samuti olulisel määral (Joonis 5). Nii lektiini-sarnaste retseptorite rühma (*KLRD1*, *KLRF1*, *KLRG1*) kui SLAM perekonna valkude (*SLAMF4*, *SLAMF6*) puhul esines kõrgeim ekspressioon T_{EMRA} rakkudes. Lektiini-sarnastest retseptoritest oli T_{EMRA} rakkudes *KLRD1* 30 korda, *KLRF1* 40 korda ja *KLRG1* 12 korda ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega ($p = 0{,}0004$; 0,0253; 0,0195). *KLRD1* oli T_{EMRA} rakkudes 4-kordselt ülesreguleeritud võrreldes T-mälurakkudega, erinevus oli statistiliselt oluline ($p = 0{,}0249$).

Uuritud SLAM perekonna valkudes (*SLAMF4*, *SLAMF6*) oli ekspressioonitase taas T_{EMRA} rakkudes ülesreguleeritud, suurim erinevus võrreldes naiivsete T-rakkudega oli *SLAMF4* geenis 266-kordne (p = 0,0003); *SLAMF6* puhul oli erinevus 4-kordne (p = 0,0002). CMV-spetsiifilistes rakkudes ekspresseerus *SLAMF4* keskmiselt 95 korda rohkem kui naiivsetes rakkudes, kuid erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks. *SLAMF6* geenis leiti statistiliselt oluline erinevus (p = 0,0171) CMV-spetsiifiliste ja T_{EMRA} rakkude ekspressioonis, nimelt CMV-spetsiifilistes rakkudes oli geen 3 korda allareguleeritud võrreldes T_{EMRA} rakkudega. Samas on CMV-spetsiifilistes rakkudes mõõdetud väga varieeruvat ekspressioonitaset ja tulemuse usalduspiirid on laiad (Joonis 5). NK-raku graanulivalgu geeni *NKG7* ekspressioonitase oli enim ülesreguleeritud CMV-spetsiifilistes rakkudes, kus erinevus naiivsete T-rakkudega oli 14-kordne (p = 0,0166), järgnesid T_{EMRA} rakud 13-kordne erinevusega (p = 0,0029). T-mälurakkudes oli *NKG7* tase keskmiselt 2,2 korda ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega (p = 0,03).



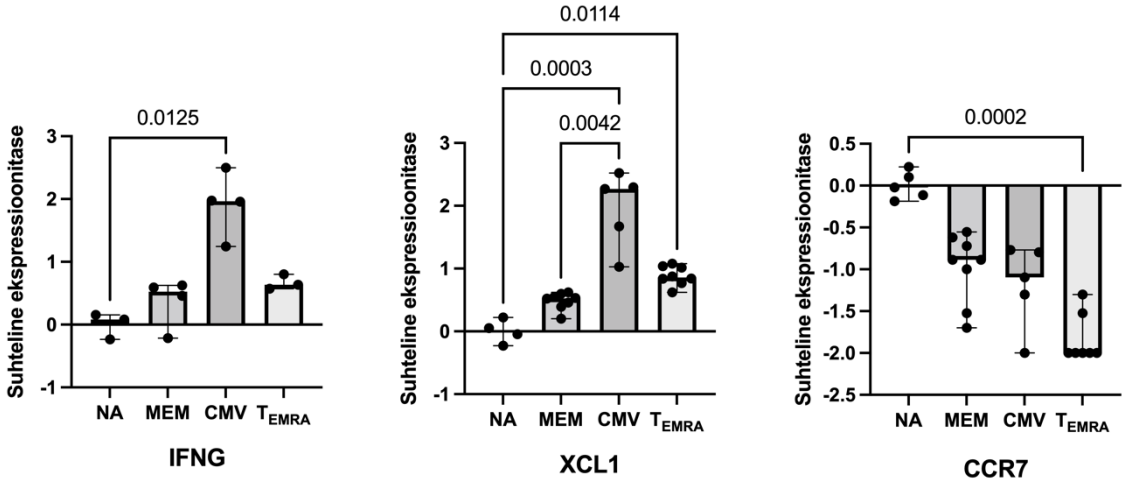
Joonis 5. NK- ehk loomulike tappurrakkude retseptorite rühma suhteline geeniekspressiooni tase erinevates CD8+ T-rakkudes. Joonisel kasutatud lühendid: NA (naiivsed $CD8^+$ T-rakud), MEM ($CD8^+$ T-mälurakud), CMV (CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud). Suhteline ekspressiooni tase on esitatud logaritmitud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusena. Tulp joonisel tähistab ekspressioonitaseme mediaani ning see on koos 95% usalduspiiridega. Graafikutele on märgitud ka statistiliselt olulised p-väärtused gruppide vahel. Kõik tulemused on esitatud naiivsete $CD8^+$ T-rakkude vastava geeni ekspressiooni suhtes. Valdavalt on NK-rakkude retseptorid oluliselt ülesreguleeritud T_{EMRA} rakkudes, *NKG7* ekspressioonitase on T_{EMRA} ja

CMV-spetsiifilistes rakkudes ligilähedane. *SLAMF6* ekspressioonitaseme mediaan on CMV-spetsiifilistes rakkudes võrdlemisi madal, samas tuleb silmas pidada tulemuse laiasid usalduspiire.

2.3.3. Tsütokiinide ja tsütokiinide retseptorite ekspressioon

Tsütokiinide ja tsütokiinide retseptorite geenide rühmast andsid kasutatavaid tulemusi vaid 3 geeni 7-st. *CCR4*, *IFNGR2*, *IL2* ja *IL2RA* ekspressiooni ei saanud adekvaatselt mõõta; võimalik, et kasutatud RT-PCR praimerid olid liiga madala efektiivsusega. Tsütokiinidest (*IFNG* ja *XCL1*) eristusid selgelt kõrgeima ekspressioonitasemega CMV-spetsiifilised rakud (Joonis 6). *IFNG* puhul oli ekspressioonitasemete erinevus naiivsete T-rakkudega 77-kordne ($p = 0{,}0125$), kemokiini ligandi *XCL1* puhul aga 185-kordne ($p = 0{,}0003$). Samuti oli *XCL1* CMV-spetsiifilistes rakkudes võrreldes T-mälurakkudega 55-kordselt ülesreguleeritud ($p = 0{,}0042$).

T_{EMRA} rakkudes ja T-mälurakkudes avaldus *IFNG* võrdlemisi samal tasemel: T_{EMRA} rakkudes oli suhteline ekspressioonitase naiivsetest T-rakkudest 3,6 korda kõrgem, T-mälurakkudes aga 2,7 korda kõrgem. Kumbki erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks. *XCL1* geeni ekspresseerisid T_{EMRA} rakud 7 korda kõrgemalt kui naiivsed T-rakud ($p = 0{,}0114$). Tsütokiini retseptorit *CCR7* ekspresseerisid kõige rohkem naiivsed T-rakud ning ülejäänud rakupopulatsioonides oli see geen allareguleeritud. T_{EMRA} rakkudes oli *CCR7* ekspressioon kõige madalam, naiivsetest T-rakkudest 95 korda väiksem ($p = 0{,}0002$).

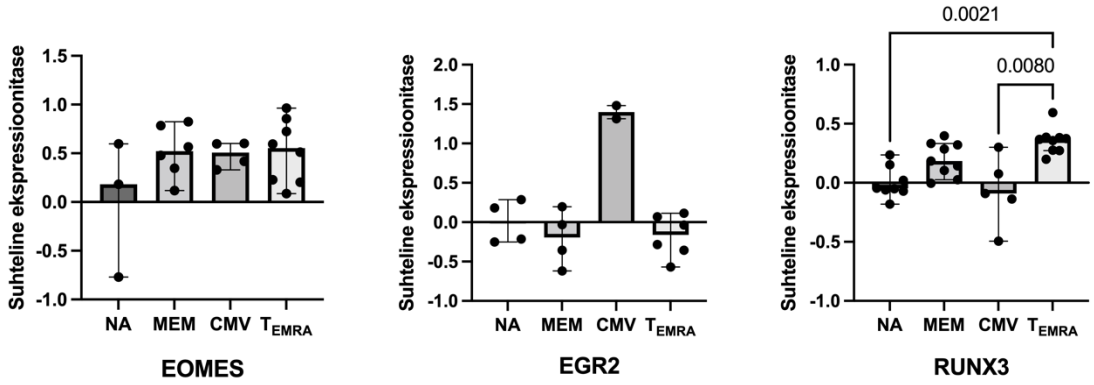


Joonis 6. Tsütokiinide ja tsütokiinide retseptorite rühma suhteline geeniekspressiooni tase erinevates CD8+ T-rakkudes. Joonisel kasutatud lühendid: NA (naiivsed $CD8^+$ T-rakud), MEM ($CD8^+$ T-mälurakud), CMV (CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud). Suhteline ekspressiooni tase on esitatud logaritmitud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusena. Tulp joonisel tähistab ekspressioonitaseme mediaani ning see on koos 95% usalduspiiridega. Graafikutele on märgitud ka statistiliselt olulised p-väärtused gruppide vahel. Kõik tulemused on esitatud naiivsete $CD8^+$ T-rakkude vastava geeni ekspressiooni suhtes. *IFNG* ja *XCL1* ekspresseerisid kõige rohkem CMV-spetsiifilised rakud. *XCL1* ekspressioon oli võrreldes naiivsete T-rakkudega ülesreguleeritud ka T_{EMRA} rakkudes. *CCR7* oli diferentseerunud T-raku

populatsioonides allareguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega, ent statistiliselt oluline erinevus esines ainult naiivsete T- ja T_{EMRA} rakkude vahel.

2.3.4. Transkriptsioonifaktorite ekspressioon

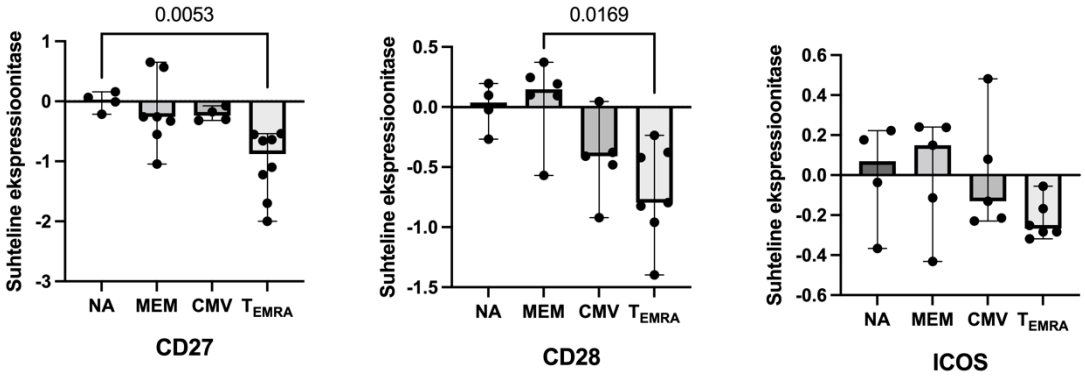
Transkriptsioonifaktoritest ilmnes statistiliselt olulisi erinevusi kidurusega seotud transkriptsiooni faktor 3 (*RUNX3, runt-related transcription factor 3*) ekspressioonis (Joonis 7), mis oli T_{EMRA} rakkudes 2,6-kordselt ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega (p = 0,0021). Samuti mõõdeti T_{EMRA} rakkudes *RUNX3* 2,9 korda kõrgemat ekspressiooni võrreldes CMV-spetsiifiliste rakkudega (p = 0,008). *EOMES* ekspressioonis märgatavaid erinevusi T-rakkude vahel ei tuvastatud. Transkriptsioonifaktori *EGR2* (*early growth response protein 2*) tulemused näitavad, et CMV-spetsiifilistes rakkudes on ekspressioon 26 korda kõrgem kui naiivsetes T-rakkudes, kuid see erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks.



Joonis 7. Transkriptsioonifaktorite rühma suhteline geenikspressiooni tase erinevates CD8+ T-rakkudes. Joonisel kasutatud lühendid: NA (naiivsed $CD8^+$ T-rakud), MEM ($CD8^+$ T-mälurakud), CMV (CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud). Suhteline ekspressiooni tase on esitatud logaritmitud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusena. Tulp joonisel tähistab ekspressioonitaseme mediaani ning see on koos 95% usalduspiiridega. Graafikutele on märgitud ka statistiliselt olulised p-väärtused gruppide vahel. Kõik tulemused on esitatud naiivsete $CD8^+$ T-rakkude vastava geeni ekspressiooni suhtes. *EOMES* ekspressioonis suuri erinevusi rakutüüpide vahel ei täheldatud, samuti ei olnud erinevused statistiliselt olulised. *EGR2* ekspressioonis domineerib küll CMV-spetsiifiliste rakkude populatsioon, kuid taaskord ei olnud erinevus statistiliselt oluline. *RUNX3* oli statistiliselt oluliselt ülesreguleeritud T_{EMRA} rakkudes.

2.3.5. Kostimulatoorsete molekulide ekspressioon

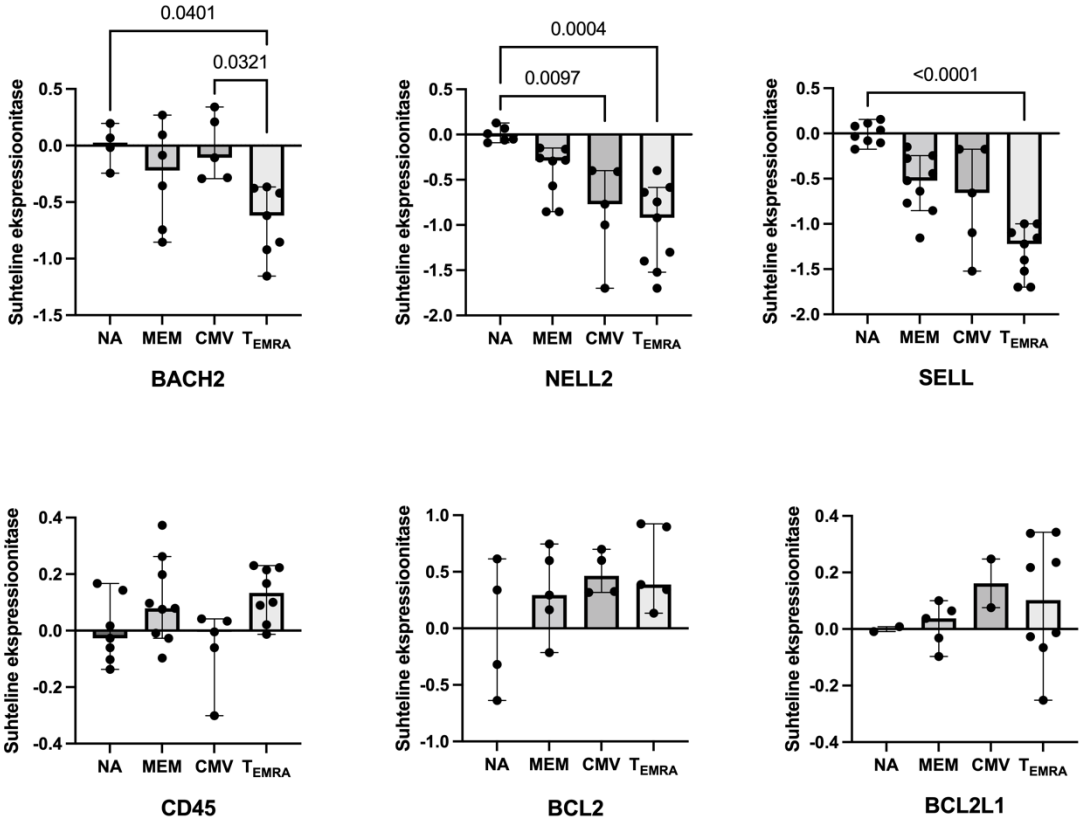
Kostimulatoorsete molekulide rühmast oli märgata nii *CD27* kui *CD28* allareguleeritust T_{EMRA} rakkudes võrreldes teiste uuritud T-rakkudega (Joonis 8). T_{EMRA} rakkudes on mõlemad geenid ligikaudu 8-kordselt allareguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega, kuid statistiliselt oluliseks osutus erinevus ainult *CD27* puhul (p = 0,0053). *CD28* ekspresseerisid T_{EMRA} rakud võrreldes T-mälurakkudega 8,8 korda vähem ning erinevus on ka statistiliselt oluline (p = 0,0169). Indutseeritava T-raku kostimulaatori (*ICOS*) ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi T-rakkude populatsioonide vahel ei täheldatud.



Joonis 8. Kostimulatoorsete molekulide rühma suhteline geenieksprессiooni tase erinevates CD8+ T-rakkudes. Joonisel kasutatud lühendid: NA (naiivsed $CD8^+$ T-rakud), MEM ($CD8^+$ T-mälurakud), CMV (CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud). Suhteline ekspressiooni tase on esitatud logaritmitud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusena. Tulp joonisel tähistab ekspressioonitaseme mediaani ning see on koos 95% usalduspiiridega. Graafikutele on märgitud ka statistiliselt olulised p-väärtused gruppide vahel. Kõik tulemused on esitatud naiivsete $CD8^+$ T-rakkude vastava geeni ekspressiooni suhtes. *CD27* on T_{EMRA} rakkudes oluliselt allareguleeritud võrreldes naiivsete rakkudega, *CD28* on T_{EMRA} rakkudes oluliselt allareguleeritud võrreldes T-mälurakkudega. *ICOS* ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

2.3.6. Muu funktsiooniga geenide ekspressioon

Statistiliselt olulisi erinevusi ekspressioonitasemetes leiti veel *BACH2*, *NELL2* ja *SELL* puhul (Joonis 9). T_{EMRA} rakkudes oli transkriptsiooni regulaatorvalk *BACH2* allareguleeritud võrreldes nii naiivsete kui ka CMV-spetsiifiliste T-rakkudega, vastavalt 4,4- ja 3,3-kordselt (p = 0,0401; 0,0321). *NELL2* oli võrreldes naiivsete T-rakkudega oluliselt allareguleeritud T_{EMRA} ja CMV-spetsiifilistes rakkudes. T_{EMRA} rakud ekspresseerisid geeni 8 korda madalamalt (p = 0,0004), CMV-spetsiifilised rakud 5,6 korda madalamalt (p = 0,0097). *SELL* oli T_{EMRA} rakkudes 16-kordselt allareguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega (p = <0,0001). *BCL2*, *BCL2L1* ja *CD45* geenide ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.



Joonis 9. Varieeruva funktsiooniga geenide suhteline geenisekspressiooni tase erinevates CD8+ T-rakkudes. Joonisel kasutatud lühendid: NA (naiivsed $CD8^+$ T-rakud), MEM ($CD8^+$ T-mälurakud), CMV (CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud). Suhteline ekspressiooni tase on esitatud logaritmitud $2^{-\Delta\Delta CT}$ väärtusena. Tulp joonisel tähistab ekspressioonitaseme mediaani ning see on koos 95% usalduspiiridega. Graafikutele on märgitud ka statistiliselt olulised p-väärtused gruppide vahel. Kõik tulemused on esitatud naiivsete $CD8^+$ T-rakkude vastava geeni ekspressiooni suhtes. *BACH2*, *NELL2* ja *SELL* puhul oli märgata T_{EMRA} rakkudes vähenenud ekspressiooni võrreldes naiivsete rakkudega. Samuti esines *NELL2* allaregulatsiooni CMV-spetsiifilistes rakkudes võrreldes naiivsete rakkudega. *BCL2*, *BCL2L1* ja *CD45* geenides olulisi erinevusi geenisekspressiooni tasemetes ei tuvastatud.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärkideks oli mõõta mitmesse funktsionaalsesse gruppi kuuluvate geenide ekspressioon 65-aastaste ja vanemate inimeste neljas erinevas T-raku populatsioonis: $CD8^+$ naiivsed T-rakud, $CD8^+$ T-mälurakud, $CD8^+$ T_{EMRA} rakud ja $CD8^+$ CMV-spetsiifilised T-rakud ja võrrelda ekspressioonitasemeid rakutüüpide kaupa. Valitud 29 geeni mõõtmistest andsid analüüsitavaid tulemusi 25 geeni. 25 geenist esines statistiliselt olulisi erinevusi ekspressioonitasemes 19 geeni puhul. Enim esines probleeme tsütokiinide ja tsütokiinide retseptorite rühma kuuluvate geenidega, kus ekspressioonitaseme mõõtmised ei andnud usaldusväärseid tulemusi *IFNGR2*, *IL2*, *IL2RA* ja *CCR4* geenides. Võimalik, et nende geenide ekspressioon oli detekteerimistpiirist madalam ja/või kasutatud ekspressioonipraimerid ei olnud optimaalse tööefektiivsusega.

2.4.1. $CD8^+$ T_{EMRA} rakkude geeniekspressioon

Tulemusest selgus, et $CD8^+$ T_{EMRA} rakkudes on võrreldes naiivsete $CD8^+$ T-rakkudega oluliselt ülesreguleeritud tsütotoksiliste molekulide nagu GZMB, GZMH, GNLY ekspressioon, mis kattuvad tulemustega varasematest uuringutest (Sallusto jt, 2004; Takata ja Takiguchi, 2006; Xu ja Larbi, 2017). Erinevalt mainitud uuringutest, ei täheldatud siin aga perforiini geeni PRF1 olulist ülesreguleeritust, mis on samuti tsütotoksiline komponent nii $CD8^+$ T-rakkude kui muude tsütolüütiliste rakkude nagu NK-rakkude arsenalis (Weng jt, 2012). Peale tsütotoksiliste molekulide leiti töös, et $CD8^+$ T_{EMRA} rakkudes on oluliselt ülesreguleeritud ka NK-rakkudele omaste valkude *KLRF1*, *NKG7* ja *SLAMF4* geenid, mida on seostatud tsütotoksilisuse regulatsiooniga $CD8^+$ T-rakkudes (Fann jt, 2005; Ng jt, 2020). Ehkki nii tsütotoksiinide kui tsütotoksilisuse regulatsiooni geenide ekspressioon oli T_{EMRA} rakkudes kõrgem T-mälurakkudest, ei olnud erinevused nende kahe populatsiooni vahel statistiliselt olulised. Kuna tööks eraldati T-mälurakud üldiste mälurakkude markerite järgi, oli populatsioon ilmselt võrdlemisi heterogeenne ja varieeruva tsütotoksilisuse aktiivsusega. Sellele viitab ka T-mälurakkude tulemuste suuremad usalduspiirid võrreldes teiste uuritud rakutüüpidega (Joonis 4).

Ka ülejäänute NK-rakkudele omaste retseptorite ekspressioon näitas T_{EMRA} rakkudes ülesreguleeritust võrreldes naiivsete T-rakkudega: mitteklassikaliste MHC molekulide äratundmises osalev *KLRD1* (Fann jt, 2005), rakuproliferatsioonile inhibeeriva mõjuga *KLRG1* (Henson jt, 2009; Voehringer jt, 2002) ja $CD8^+$ T-rakkude immuunvastust inhibeeriv *SLAMF6* (Hajaj jt, 2020; Yigit jt, 2019) olid T_{EMRA} rakkudes oluliselt ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega. *KLRD1* ja *KLRG1* ekspressiooni on $CD8^+$ T-rakkudes kirjeldatud kui vananenud raku tunnust (Chen jt, 2013; Fann jt, 2005). *KLRD1* tulemustes leiti statistiliselt oluline ülesreguleeritus T_{EMRA} rakkudes võrreldes T-mälurakkudega, kuid see oli NK-rakkudele omaste geenide hulgast ainuke, kus selline erinevus avaldus.

Geenid, mille allaregulatsiooni on hilises diferentseerumisstaadiumis $CD8^+$ T-rakkudes täheldatud on *CCR7*, *SELL*, *CD27* ja *CD28* (Appay jt, 2008; Weng jt, 2009; Xu ja Larbi, 2017). *CCR7*, *SELL* ja *CD27* ekspressioonis leiti antud töös statistiliselt oluline allareguleeritus T_{EMRA} rakkudes võrreldes naiivsete rakkudega. *CD28* ekspressioonis tuvastati T_{EMRA} rakkudes oluline allareguleeritus ainult võrreldes T-mälurakkudega, mis on mõnevõrra vastuolus seni kirjanduses avaldatud andmetega: *CD28* ekspressioon kaob tüüpiliselt varem kui *CD27* ekspressioon ja $CD28^+$ T-rakke leiab rohkem naiivsest populatsioonist (Appay jt, 2008; Larbi ja Fulop, 2014).

Tsütokiinide hulgast oli T_{EMRA} rakkude *IFNG* ekspressioonitase ligilähedane üldise T-mälurakkude populatsiooni ekspressioonitasemega. Varasemates uurimustes on $CD8^+$ T-rakkudes *IFNG* ekspressioon korreleerunud diferentseerumisstaadiumiga: hilisemas diferentseerumisstaadiumis $CD8^+$ T-rakud sünteesivad rohkem *IFNG* (Appay jt, 2008). Käesolev töö korrelatsiooni ei kinnitanud, sest T_{EMRA} rakkude *IFNG* ekspressioonis ei tuvastatud statistiliselt olulisi erinevusi ei naiivsete T-rakkudega ega T-mälurakkudega võrreldes. *XCL1* ekspressioon oli T_{EMRA} rakkudes ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega, kuid T-mälurakkude ekspressioonimediaaniga statistiliselt olulist erinevust ei olnud. Nii IFN-γ kui XCL1 on seostatud $CD8^+$ T-rakkude tsütotoksilise immuunvastuse regulatsiooniga (Bhat jt, 2017; Lei ja Takahama, 2012).

Transkriptsioonifaktoritest mõõdeti T_{EMRA} rakkudes statistiliselt oluline ülesreguleeritus *RUNX3* geenis võrreldes nii naiivsete kui CMV-spetsiifiliste T-rakkudega. *RUNX3* reguleerib teise transkriptsioonifaktori, *EOMES*-i (eomesodermiini) avaldumist, mis on omakorda oluline tsütotoksiliste efektormolekulide nagu gransüüm B, perforiini ja tsütokiin IFN-γ sünteesi reguleerimisel (Cruz-Guilloty jt, 2009). Käesolevas töös *EOMES* geeni ekspressioonis aga ühtegi statistiliselt olulist erinevust ei mõõdetud. Transkriptsioonifaktori *EGR2* geeni ekspressioon oli T_{EMRA} rakkudes pigem allareguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega, kuid erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks. *EGR2* madalat ekspressiooni on T-rakkudes seostatud hüperaktiveerituse ja diferentseerumisega, sealjuures on *EGR2* puudumisel defektne klonaalne paljunemine (Miao jt, 2017).

Olulisi erinevusi geeniekspressiooni tasemes leiti T_{EMRA} rakkude puhul veel *BACH2* ja *NELL2* geenides, mis olid T_{EMRA} rakkudes allareguleeritud võrreldes nii naiivsete T-rakkude kui CMV-spetsiifiliste rakkudega. *BACH2* on transkriptsiooniline repressor, mille ekspressioon surub alla terminaalsele diferentseerumisele suunavad signaalrajad ja mille allareguleeritust on märgatud just kurnatud ja hilises diferentseerumisstaadiumis olevates T-rakkudes (Yao jt, 2021). Sealjuures on huvitav, et T_{EMRA} rakkudes leiti statistiliselt oluline allaregulatsioon võrreldes ka CMV-spetsiifiliste T-rakkudega, mis on fenotüübiliselt enamjaolt T_{EMRA} sarnased rakud (Chidrawar jt, 2009; Strindhall jt, 2013). Selle markeri alusel paistab, et CMV-spetsiifiliste T-rakkude hulgas on siiski ka suurema diferentseerumispotentsiaaliga rakke erinevalt T_{EMRA} rakkude populatsioonist. *NELL2* on kasvufaktor, mis identifitseeriti esmalt närvirakkudes ja mille ekspressioon on seotud proliferatsiooni soodustamise ja apoptoosi inhibeerimisega (Liu jt, 2021). Selle ekspressiooni on T-rakkudes kirjeldatud naiivsete ja varajases diferentseerumisstaadiumis T-mälurakkude markerina (Sekine jt, 2020). *NELL2*

allaregulatsioon T_{EMRA} rakkudes võrreldes naiivsete T-rakkudega korreleerub T_{EMRA}-de madala prolifereerumisvõimega.

T_{EMRA} rakkudes ei leitud statistiliselt olulist erinevust *BCL2*, *BCL2L1*, *CD45* ja *ICOS* geenide ekspressioonis. *BCL2* ja *BCL2L1* on potentsed antiapoptootilised valgud, inhibeerides kaspaaside aktiveerumist (Geginat et al., 2003). Türosiini fosfataas *CD45* reguleerib T-rakkude aktiveerumist, filtreerides välja APC-delt tulnud nõrkasid signaale, mille puhul oleks T-rakuline aktiveerumine ebavajalik (Courtney jt, 2019). Indutseeritav T-raku kostimulaator (*ICOS*) on CD28 perekonda kuuluv kostimulatoorne faktor, mille ekspressiooni on kirjeldatud kui T-rakkudes antigeeniga stimuleerides proliferatiivset aktiivsust tõstvat faktorit (Hutloff jt, 1999; Le jt, 2018).

2.4.2. $CD8^+$ CMV-spetsiifiliste T-rakkude geeniekspressioon

Antud töö tulemustes paistsid CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud silma kui potentsed tsütokiinide tootjad, ekspresseerides nii *IFNG* kui *XCL1* geene kõrgemalt kui T_{EMRA} rakud. Rakupopulatsioonide vahelisi erinevusi ei kinnitanud aga statistilised testid, mis võib olla mõjutatud CMV-spetsiifiliste T-rakkude väikesest andmestikust. Ehkki CMV-spetsiifilised $CD8^+$ T-rakud eraldati kõikide uuringusse kaasatud patsientide verest, ei saadud kõikidest piisavalt hea kvaliteediga RNA-d, mistõttu mõõtmisi CMV-spetsiifilises populatsioonis on vähem kui teistes uuritud diferentseerunud rakkude populatsioonides. Seetõttu on CMV-spetsiifiliste T-rakkude kohta konkreetse järelduste tegemine keerulisem kui T_{EMRA} rakkudes.

Hilise diferentseerumisega seotud markerite puhul (allareguleeritud *CCR7*, *SELL*, *CD27*, *CD28*, ülesreguleeritud *KLRG1*) ei täheldatud CMV-spetsiifilistes T-rakkudes olulisi erinevusi võrreldes naiivsete T-rakkudega, *CD27* ja *KLRG1* geenide ekspressioonimediaanid olid CMV-spetsiifilistes T-rakkudes võrreldavad T-mälurakkude populatsiooni ekspressioonimediaanidega. *CCR7* ja *SELL* puhul oli näha CMV-spetsiifilistes rakkudes mõningat allaregulatsiooni võrreldes T-mälurakkudega, kuid jällegi ei olnud erinevused statistiliselt olulised. Sealjuures kajastus CMV-spetsiifilistest rakkudest kirjandusest leitud uuringute trend, kus *CD28* ekspressioon kaob enne *CD27* ekspressiooni (Appay jt, 2008; Larbi ja Fulop, 2014). *CD28* ekspressioon oli CMV-spetsiifilistes T-rakkudes väiksem kui *CD27* ekspressioon.

NK-rakkudele omastest valkudest esines CMV-spetsiifilistes T-rakkudes olulisi ekspressioonitaseme erinevusi *NKG7* ja *SLAMF6* geenides. *NKG7* oli CMV-spetsiifilistes T-rakkudes oluliselt ülesreguleeritud, ekspresseerudes isegi pisut kõrgemalt kui T_{EMRA} rakkudes. *SLAMF6* ekspressioonis oli oluline ekspressioonitasemete erinevus CMV-spetsiifiliste T-rakkude ja T_{EMRA} rakkude ekspressioonis, CMV-spetsiifilistes rakkudes oli *SLAMF6* oluliselt

allareguleeritud. *SLAMF6* on kirjeldatud kui $CD8^+$ T-rakkude immuunvastust inhibeerivat faktorit (Hajaj jt, 2020; Yigit jt, 2019), mis antud juhul võiks viidata CMV-spetsiifiliste T-rakkude paremale immuunvastuse tekkele võrreldes T_{EMRA} rakkudega. Samas tuleb silmas pidada CMV-spetsiifiliste T-rakkude *SLAMF6* ekspressioonimediaani laiasid usalduspiire (Joonis 5), mistõttu peaks kindlamate vastuste saamiseks katseid kordama. *KLRF1*, *KLRD1* ja *SLAMF4* NK-rakkude retseptorid olid küll CMV-spetsiifilistes rakkudes kõrgemini ekspresseerunud kui naiivsetes T-rakkudes ja T-mälurakkudes, kuid statistiliselt olulisi erinevusi ei tuvastatud.

Tsütotoksilistest geenidest oli CMV-spetsiifilistes T-rakkudes kõrgelt ekspresseeritud *GZMB* ja *PRF1*. Perforiini geeni *PRF1* ekspressioonis tuvastati statistiliselt oluline erinevus võrreldes naiivsete T-rakkudega, *GZMB* puhul oli statistiliselt oluline erinevus võrreldes nii naiivsete T-rakkude kui T-mälurakkudega. *GZMB* ja *PRF1* ekspressioon oli CMV-spetsiifilistes T-rakkudes sealjuures kõrgem kui T_{EMRA} rakkudes. Perforiini ja gransüüm B ekspressiooni ülesreguleeritust CMV-spetsiifilistes $CD8^+$ T-rakkudes on mõõdetud ka teistes uurimustes, sealjuures just varase staadiumi rakkudes, kes pole veel latentseks muutunud (Hertoghs et al., 2010). CMV-spetsiifiliste $CD8^+$ T-rakkude puhul on märgatud, et latentses staadiumis nende tsütolüütiline funktsioon mandub (van Lier jt, 2003).

Statistiliselt olulisi erinevusi CMV-spetsiifiliste T-rakkude geenikespressioonis tuvastati veel *RUNX3*, *BACH2* ja *NELL2* ekspressioonis. Transkriptsioonifaktor *RUNX3*, mis on seotud tsütolüütiliste geenide avaldumisega, ekspresseerus CMV-spetsiifilistes T-rakkudes vähem kui T_{EMRA} rakkudes, erinevus oli sealjuures statistiliselt oluline. Tulemus läheb vastuollu CMV-spetsiifiliste T-rakkude kõrge *IFNG*, *GZMB* ja *PRF1* ekspressioonitasemega, mis peaks *RUNX3* puudulikkusel just vähenema (Cruz-Guilloty jt, 2009). Edasistes uuringutes võiks katseid korrata, et leida kas erinevus oli põhjustatud katselisest veast või on CMV-spetsiifilistes rakkudes tsütolüütiliste faktorite ekspressioon *RUNX3* avaldumisest sõltumatu.

Nagu eelmises peatükis mainiti, oli *BACH2* ekspressioon CMV-spetsiiflistes rakkudes oluliselt allareguleeritud võrreldes T_{EMRA} rakkudega, mis võiks viidata CMV-spetsiifilise rakupopulatsioonis suurema diferentseerumisvõimega rakkudele. *NELL2* oli aga CMV-spetsiifilistes T-rakkudes oluliselt alla reguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega, mis annab märku, et CMV-spetsiifiliste T-rakud on siiski „keskealised“, kuna *NELL2* ekspressioon on tüüpiliselt naiivsete ja varajases diferentseerumisstaadiumis olevate T-rakkude marker (Sekine jt, 2020).

Sarnaselt T_{EMRA} rakkudele ei leitud CMV-spetsiifilistes T-rakkudes olulisi ekspressioonitaseme erinevusi antiapoptootilistes valkudes *BCL2* ja *BCL2L1*, türosiini fosfataasis *CD45*, T-rakkude

kostimulatoorses molekulis *ICOS* ja transkriptsioonifaktoris *EOMES*. Transkriptsioonifaktori *EGR2* mõõtmistes on CMV-spetsiifilised T-rakud küll geeni kõige rohkem ekspresseerinud, mis korreleeruks nende suure klonaalse paljunemise võimega (Miao jt, 2017), kuid tulemus ei osutunud ilmselt väikse andmestiku tõttu statistiliselt oluliseks.

Just väikest andmestikku võib antud töö suurimaks puuduseks lugeda. Mitmete geenide puhul oli ainult paar usaldusväärset andmepunkti populatsiooni kohta, mis teeb üldistamise keeruliseks. Võimalik, et siin võis rolli mängida ka disainitud ekspressioonipraimerite suboptimaalne efektiivsus. See-eest joonistusid mitmes geenis välja väga varieeruvad ekspressioonitasemed populatsiooniti, eriti just T-mälurakkude ja T_{EMRA} rakkude puhul. Edasised uuringud võiksid keskenduda just nende populatsioonide heterogeensuse uurimisele, sekveneerides transkriptoomi raku tasemel (*single-cell transcriptome sequencing*).

KOKKUVÕTE

Vananedes toimuvad immuunsüsteemi T-rakkudes nihked diferentseerituma populatsiooni suunas. $CD8^+$ T_{EMRA}-rakud on üks defineeritud T-rakkude alampopulatsioon, mille suurenemist on vanusega täheldatud. Samuti peetakse $CD8^+$ T_{EMRA}-rakkude indutseerijateks latentseid viirusi nagu CMV. T_{EMRA}-rakke iseloomustab kõrge efektorfunktsioon, põletikku esilekutsuv senestsentsile omane sekretoom SASP ja arestitud rakutsükkel. $CD8^+$ T_{EMRA}-rakkude täpne mõju vanemaealiste inimeste immuunsusele on veel teadmata, kuid neid on seostatud nii mitmete haiguste patogeneesi ja süvenemisega kui ka halvemate vaktsiinivastustega vanemates inimestes.

Käesolevas töös kaasati valimisse 10 patsienti Tartu Ülikooli Kliinikumist, kes olid kõik 65-aastased või vanemad. Nende verest eraldatud rakud sorditi nelja erinevasse $CD8^+$ T-rakkude populatsiooni: naiivsed, mälurakud, CMV-spetsiifilised rakud ja T_{EMRA}-d. Kasutades reaalaja PCR meetodit, mõõdeti kõikides rakutüüpides 29 erineva geeni ekspressioon. Uuritud geenide hulgas oli nii tsütotoksilisuse ja selle regulatsiooniga seotud geene, NK-rakkude retseptorite geene ning erinevaid diferentseerumismarkereid.

Töö eesmärgiks oli võrrelda rakupopulatsioonide geenieksрessiooni omavahel ja iseloomustada võimalikke erinevusi. $CD8^+$ T_{EMRA}-rakkudes märgati nii tsütotoksiliste ainete kui tsütotoksilisuse regulatsioonis osalevate valkude olulist ülesreguleeritust võrreldes naiivsete $CD8^+$ T-rakkudega. Samuti oli T_{EMRA}-rakkudes oluliselt kõrgem NK-rakkudele omaste retseptorite ekspressioon. T_{EMRA}-rakkudes olid oluliselt allareguleeritud peaaegu kõik uuritud naiivsete T-rakkude tunnusgeenid. CMV-spetsiifilistes T-rakkudes märgati eelkõige tsütokiinide suurt ülesreguleeritust võrreldes naiivsete T-rakkudega, samuti oli ülesreguleeritud mitmete tsütotoksiliste ainete ekspressioon. Erinevalt T_{EMRA}-rakkudest, oli CMV-spetsiifilistes T-rakkudes ainult üks NK-rakkudele omane geen oluliselt ülesreguleeritud võrreldes naiivsete T-rakkudega. Samuti oli CMV-spetsiifilistes T-rakkudes mitmete naiivsetele rakkudele omaste geenide ekspressioon T-mälurakkudega sarnasel tasemel ja statistiliselt ebaoluliselt allareguleeritud. Geenieksрessiooni erinevusi võrreldes T-mälurakkudega leiti vähe nii T_{EMRA} kui CMV-spetsiifiliste rakkude puhul, mis viitab vanemate inimeste $CD8^+$ T-mälurakkude heterogeensusele nii tsütolüütilistes võimetes kui diferentseerumisstaadiumites.

SUMMARY

Gene expression in the CD8$^+$ T_{EMRA} and CD8$^+$ CMV-positive T cells of people aged 65 and above

Liisa-Miina Pilv

Aging of the T cell compartment is characterized by a shift towards a more differentiated phenotype. It has been proven that the antigen-inexperienced or naive population of T cells shrinks with age and in turn, more differentiated cells such as T_{EMRA} accumulate. CD8$^+$ T cells are considered especially vulnerable to these changes. T_{EMRA} cells are terminally differentiated cells that re-express CD45RA. Typically known as a marker of naive T cells, it has now been shown to express on late-stage T cells as well. T_{EMRA} cells are akin to senescent cells, as they present shortened telomeres and DNA damage as well as having a secretome reminiscent of senescent cells (also known as SASP). They are also in cell cycle arrest, unlike truly senescent cells however, the cell cycle arrest in T_{EMRA} cells has been shown to be reversible. T_{EMRA} cells also maintain their effector function and have potent cytotoxic and inflammatory capabilities. Apart from age, T_{EMRA} have also been shown to accumulate with latent viral infections, such as the cytomegalovirus (CMV) infection. The clinical significance of T_{EMRA} cells is poorly understood, however it has been linked to the development of several diseases and is associated with poorer vaccine responses in the elderly.

This study aimed to measure and compare the gene expression in four different CD8$^+$ T cell populations in people aged 65 and over. Blood samples were collected from 10 patients from the Internal Medicine Clinic and Dermatology Clinic of Tartu University Hospital. The CD8$^+$ T cell populations of interest included naive T cells, memory T cells, CMV-specific T cells and T_{EMRA} cells. The expression of 29 different genes was measured using RT-PCR, of which 25 gave results.

CD8$^+$ T_{EMRA} cells showed a significant increase compared to CD8$^+$ naive T cells in the expression of many genes involved in cytotoxicity. T_{EMRA} cells also upregulated the expression of natural killer cell (NK-cell) receptors. Compared to naive T cells, T_{EMRA} cells expressed lower levels of most markers associated with naive T cells. CMV-specific cells had significantly increased levels of cytokine expression compared to naive T cells, even moreso than T_{EMRA} cells. Unlike T_{EMRA} cells however, CMV-specific cells didn't show a statistically significant increase in NK-cell receptor expression. No significant difference between CMV-specific and naive T cells was reported in the expression of naive T cell markers.

TÄNUSÕNAD

Tahan tänada oma juhendajaid Lehte Türki ja Liina Tserelit nende kannatlikkuse ja suure abi eest töö valmimisel. Tänan ka kaasjuhendajat Viljar Jaksi, kelle kasulikud kommentaarid aitasid tööd lihvida. Samuti tänan molekulaarpatoloogia uurimisgrupi juhti Pärt Petersoni, kes andis mulle võimaluse mind huvitavat teemat uurida. Viimasena tänan kõiki molekulaarpatoloogia uurimisgrupi liikmeid, kes aitasid nii nõu, jõu kui maiustustega.

KIRJANDUSE LOETELU

Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2017). Chapter 1 – Properties and Overview of Immune Responses, lk 4-6. Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S, Cellular and Molecular Immunology, 9th ed. Elsevier, Philadelphia, PA.

Abedin, S., Michel, J. J., Lemster, B., & Vallejo, A. N. (2005). Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: The new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Experimental Gerontology*, *40*(7), 537–548. https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.04.012

Akbar, A. N., Beverley, P. C. L., & Salmon, M. (2004). Will telomere erosion lead to a loss of T-cell memory? *Nature Reviews Immunology*, *4*(9), 737+. Gale Academic OneFile.

Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C., & Janossy, G. (1988). Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *The Journal of Immunology*, *140*(7), 2171–2178.

Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., … Rowland-Jones, S. L. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*, *8*(4), 379–385. https://doi.org/10.1038/nm0402-379

Appay, V., van Lier, R. A. W., Sallusto, F., & Roederer, M. (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry Part A*, *73A*(11), 975–983. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20643

Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., & Frazer, I. H. (2017). Interferon-γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death & Disease*, *8*(6), e2836–e2836. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.67

Biron, C. A. (2016). Chapter 4 - Innate Immunity: Recognizing and Responding to Foreign Invaders—No Training Needed, lk 41–55. M. G. Katze, M. J. Korth, G. L. Law, & N. Nathanson (Toim), Viral Pathogenesis (Third Edition). Academic Press, Cambridge, MA.

Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. A., & Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, *10*(1), 29–37. https://doi.org/10.1038/ni.1679

Borghans, J. A. M., Tesselaar, K., & de Boer, R. J. (2018). Current best estimates for the average lifespans of mouse and human leukocytes: Reviewing two decades of deuterium-labeling experiments. *Immunological Reviews*, *285*(1), 233–248. https://doi.org/10.1111/imr.12693

Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological Reviews*, *99*(2), 1047–1078. https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018

Callender, L. A., Carroll, E. C., Beal, R. W. J., Chambers, E. S., Nourshargh, S., Akbar, A. N., & Henson, S. M. (2018). Human CD8(+) EMRA T cells display a senescence-

associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. *Aging Cell*, *17*(1). https://doi.org/10.1111/acel.12675

Callender, L. A., Carroll, E. C., Bober, E. A., Akbar, A. N., Solito, E., & Henson, S. M. (2020). Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence. *Aging Cell*, *19*(2), e13067. https://doi.org/10.1111/acel.13067

Campisi, J. (2005). Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell*, *120*(4), 513–522. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.003

Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, *20*(4), 202–213. https://doi.org/10.1002/rmv.655

Cavanagh, M. M., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2012). Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance. *Current Opinion in Immunology*, *24*(4), 488–493. https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.04.003

Chen, G., Lustig, A., & Weng, N. (2013). T Cell Aging: A Review of the Transcriptional Changes Determined from Genome-Wide Analysis. *Frontiers in Immunology*, *4*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00121

Chidrawar, S., Khan, N., Wei, W., McLarnon, A., Smith, N., Nayak, L., & Moss, P. (2009). Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. *Clinical and Experimental Immunology*, *155*(3), 423–432. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03785.x

Chua, J. V., & Chen, W. H. (2010). Herpes zoster vaccine for the elderly: Boosting immunity. *Aging Health*, *6*(2), 169–176. https://doi.org/10.2217/ahe.10.5

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *5*(1), 99–118. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144

Courtney, A. H., Shvets, A. A., Lu, W., Griffante, G., Mollenauer, M., Horkova, V., Lo, W.-L., Yu, S., Stepanek, O., Chakraborty, A. K., & Weiss, A. (2019). CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Science Signaling*, *12*(604), eaaw8151. https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw8151

Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M. E., Djuretic, I. M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M. G., Groner, Y., & Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(1), 51–59. https://doi.org/10.1084/jem.20081242

Czesnikiewicz-Guzik, M., Lee, W.-W., Cui, D., Hiruma, Y., Lamar, D. L., Yang, Z.-Z., Ouslander, J. G., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2008). T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *127*(1), 107–118. https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.12.002

Derhovanessian, E., Maier, A. B., Hähnel, K., Beck, R., de Craen, A. J. M., Slagboom, E. P., Westendorp, R. G. J., & Pawelec, G. (2011). Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+

T-cells in humans. *The Journal of General Virology*, *92*(Pt 12), 2746–2756. https://doi.org/10.1099/vir.0.036004-0

Derhovanessian, E., Maier, A. B., Hähnel, K., Zelba, H., de Craen, A. J. M., Roelofs, H., Slagboom, E. P., Westendorp, R. G. J., & Pawelec, G. (2013). Lower proportion of naïve peripheral CD8+ T cells and an unopposed pro-inflammatory response to human Cytomegalovirus proteins in vitro are associated with longer survival in very elderly people. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, *35*(4), 1387–1399. https://doi.org/10.1007/s11357-012-9425-7

Di Mitri, D., Azevedo, R. I., Henson, S. M., Libri, V., Riddell, N. E., Macaulay, R., Kipling, D., Soares, M. V. D., Battistini, L., & Akbar, A. N. (2011). Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *187*(5), 2093–2100. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100978

Dolfi, D. V., & Katsikis, P. D. (2007). CD28 and CD27 costimulation of CD8+ T cells: A story of survival. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *590*, 149–170. https://doi.org/10.1007/978-0-387-34814-8_11

Dugan, H. L., Henry, C., & Wilson, P. C. (2020). Aging and influenza vaccine-induced immunity. *Cellular Immunology*, *348*, 103998. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103998

Dunne, P. J., Faint, J. M., Gudgeon, N. H., Fletcher, J. M., Plunkett, F. J., Soares, M. V. D., Hislop, A. D., Annels, N. E., Rickinson, A. B., Salmon, M., & Akbar, A. N. (2002). Epstein-Barr virus–specific CD8+ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. *Blood*, *100*(3), 933–940. https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0160

Fann, M., Chiu, W. K., Wood III, W. H., Levine, B. L., Becker, K. G., & Weng, N. (2005). Gene expression characteristics of CD28null memory phenotype CD8+ T cells and its implication in T-cell aging. *Immunological Reviews*, *205*(1), 190–206. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00262.x

Förster, R., Davalos-Misslitz, A. C., & Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(5), 362–371. https://doi.org/10.1038/nri2297

Gao, X., Yu, X., Zhang, C., Wang, Y., Sun, Y., Sun, H., Zhang, H., Shi, Y., & He, X. (2022). Telomeres and Mitochondrial Metabolism: Implications for Cellular Senescence and Age-related Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1–13. https://doi.org/10.1007/s12015-022-10370-8

Geginat, J., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, *101*(11), 4260–4266. https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3577

Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, *2*(5), 309–322. https://doi.org/10.1038/nri798

Gibson, K. L., Wu, Y.-C., Barnett, Y., Duggan, O., Vaughan, R., Kondeatis, E., Nilsson, B.-O., Wikby, A., Kipling, D., & Dunn-Walters, D. K. (2009). B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Aging Cell*, *8*(1), 18–25. Scopus. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00443.x

Godlove, J., Chiu, W. K., & Weng, N. (2007). Gene expression and generation of CD28- CD8 T cells mediated by interleukin 15. *Experimental gerontology*, *42*(5), 412–415. https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.11.015

Goronzy, J. J., Fulbright, J. W., Crowson, C. S., Poland, G. A., O'Fallon, W. M., & Weyand, C. M. (2001). Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *Journal of Virology*, *75*(24), 12182–12187. https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12182-12187.2001

Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2013). Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nature Immunology*, *14*(5), 428–436. https://doi.org/10.1038/ni.2588

Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2019). Mechanisms underlying T cell ageing. *Nature Reviews. Immunology*, *19*(9), 573–583. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0180-1

Griffiths, S. J., Riddell, N. E., Masters, J., ... Akbar, A. N. (2013). Age Associated Increase of Low Avidity CMV-Specific CD8+ T Cells That Re-Express CD45RA. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(11), 5363–5372. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203267

Gustafson, C. E., Kim, C., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2020). Influence of immune aging on vaccine responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *145*(5), 1309–1321. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.03.017

Hajaj, E., Eisenberg, G., Klein, S., ... Lotem, M. (2020). SLAMF6 deficiency augments tumor killing and skews toward an effector phenotype revealing it as a novel T cell checkpoint. *eLife*, *9*, e52539. https://doi.org/10.7554/eLife.52539

Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R., & van Lier, R. A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*(9), 1407–1418. https://doi.org/10.1084/jem.186.9.1407

Henry, C., Zheng, N.-Y., Huang, M., … Wilson, P. C. (2019). Influenza Virus Vaccination Elicits Poorly Adapted B Cell Responses in Elderly Individuals. *Cell Host & Microbe*, *25*(3), 357-366.e6. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.002

Henson, S. M., Franzese, O., Macaulay, R., ... Akbar, A. N. (2009). KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood*, *113*(26), 6619–6628. https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-199588

Hertoghs, K. M. L., Moerland, P. D., van Stijn, A., Remmerswaal, E. B. M., Yong, S. L., van de Berg, P. J. E. J., van Ham, S. M., Baas, F., ten Berge, I. J. M., & van Lier, R. A. W. (2010). Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(11), 4077–4090. https://doi.org/10.1172/JCI42758

Holtappels, R., Pahl-Seibert, M.-F., Thomas, D., & Reddehase, M. J. (2000). Enrichment of Immediate-Early 1 (m123/pp89) Peptide-Specific CD8 T Cells in a Pulmonary CD62Llo Memory-Effector Cell Pool during Latent Murine Cytomegalovirus Infection of the Lungs. *Journal of Virology*, *74*(24), 11495–11503.

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., & Kroczek, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, *397*(6716), 263–266. https://doi.org/10.1038/16717

Ibegbu, C. C., Xu, Y.-X., Harris, W., Maggio, D., Miller, J. D., & Kourtis, A. P. (2005). Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8+ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *174*(10), 6088–6094. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6088

Jameson, S. C., & Masopust, D. (2018). Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*, *48*(2), 214–226. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.010

Klenerman, P. (2018). The (gradual) rise of memory inflation. *Immunological Reviews*, *283*(1), 99–112. https://doi.org/10.1111/imr.12653

Kogut, I., Scholz, J. L., Cancro, M. P., & Cambier, J. C. (2012). B cell maintenance and function in aging. *Seminars in Immunology*, *24*(5), 342–349. https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.004

Korndewal, M. J., Mollema, L., Tcherniaeva, I., van der Klis, F., Kroes, A. C. M., Oudesluys-Murphy, A. M., Vossen, A. C. T. M., & de Melker, H. E. (2015). Cytomegalovirus infection in the Netherlands: Seroprevalence, risk factors, and implications. *Journal of Clinical Virology*, *63*, 53–58. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.11.033

Lanfermeijer, J., Borghans, J. A. M., & van Baarle, D. (2020). How age and infection history shape the antigen-specific CD8+ T-cell repertoire: Implications for vaccination strategies in older adults. *Aging Cell*, *19*(11), e13262. https://doi.org/10.1111/acel.13262

Larbi, A., & Fulop, T. (2014). From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: When markers predict functionality. *Cytometry Part A*, *85*(1), 25–35. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22351

Le, K.-S., Amé-Thomas, P., Tarte, K., ... Olive, D. (2018). CXCR5 and ICOS expression identifies a CD8 T-cell subset with TFH features in Hodgkin lymphomas. *Blood Advances*, *2*(15), 1889–1900. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018017244

Lei, Y., & Takahama, Y. (2012). XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes and Infection*, *14*(3), 262–267. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.003

Libri, V., Azevedo, R. I., Jackson, S. E., ... Akbar, A. N. (2011). Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+ CD45RA+ CD27− T cells: The potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology*, *132*(3), 326–339. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03386.x

Litjens, N. H. R., de Wit, E. A., & Betjes, M. G. H. (2011). Differential effects of age, cytomegalovirus-seropositivity and end-stage renal disease (ESRD) on circulating T lymphocyte subsets. *Immunity and Ageing*, *8*. https://doi.org/10.1186/1742-4933-8-2

Liu, J., Liu, D., Zhang, X., Li, Y., Fu, X., He, W., Li, M., Chen, P., Zeng, G., DiSanto, M. E., Wang, X., & Zhang, X. (2021). NELL2 modulates cell proliferation and apoptosis via

ERK pathway in the development of benign prostatic hyperplasia. *Clinical Science*, *135*(13), 1591–1608. https://doi.org/10.1042/CS20210476

Liuzzo, G., Goronzy, J. J., Yang, H., Kopecky, S. L., Holmes, D. R., Frye, R. L., & Weyand, C. M. (2000). Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*, *101*(25), 2883–2888. https://doi.org/10.1161/01.cir.101.25.2883

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194–1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039

Martens, P. B., Goronzy, J. J., Schaid, D., & Weyand, C. M. (1997). Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, *40*(6), 1106–1114. https://doi.org/10.1002/art.1780400615

Miao, T., Symonds, A. L. J., Singh, R., Symonds, J. D., Ogbe, A., Omodho, B., Zhu, B., Li, S., & Wang, P. (2017). Egr2 and 3 control adaptive immune responses by temporally uncoupling expansion from T cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(6), 1787–1808. https://doi.org/10.1084/jem.20160553

Mittelbrunn, M., & Kroemer, G. (2021). Hallmarks of T cell aging. *Nature Immunology*, *22*(6), 687–698. https://doi.org/10.1038/s41590-021-00927-z

Montgomery, R. R., & Shaw, A. C. (2015). Paradoxical changes in innate immunity in aging: Recent progress and new directions. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(6), 937–943. https://doi.org/10.1189/jlb.5MR0315-104R

Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., & Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*, *12*(2), 661–684. https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001

Ng, S. S., De Labastida Rivera, F., Yan, J., … Engwerda, C. R. (2020). The NK cell granule protein NKG7 regulates cytotoxic granule exocytosis and inflammation. *Nature Immunology*, *21*(10), 1205–1218. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0758-6

Nikolich-Žugich, J. (2018). The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system. *Nature Immunology*, *19*(1), 10–19. https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x

Northfield, J., Lucas, M., Jones, H., Young, N. T., & Klenerman, P. (2005). Does memory improve with age? CD85j (ILT-2/LIR-1) expression on CD8+ T cells correlates with 'memory inflation' in human cytomegalovirus infection. *Immunology & Cell Biology*, *83*(2), 182–188. https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01321.x

Pangrazzi, L., & Weinberger, B. (2020). T cells, aging and senescence. *Experimental Gerontology*, *134*, 110887. https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110887

Pawelec, G. (2018). Age and immunity: What is "immunosenescence"? *Experimental Gerontology*, *105*, 4–9. https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024

Pearce, E. L., Mullen, A. C., Martins, G. A., ... Reiner, S. L. (2003). Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5647), 1041–1043. https://doi.org/10.1126/science.1090148

Pereira, B. I., De Maeyer, R. P. H., Covre, L. P., … Akbar, A. N. (2020). Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *21*(6), 684–694. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3

Pipeling, M. R., West, E. E., Osborne, C. M., ... McDyer, J. F. (2008). Differential CMV-specific CD8+ effector T cell responses in the lung allograft predominate over the blood during human primary infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *181*(1), 546–556. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.546

Qi, Q., Cavanagh, M. M., Le Saux, S., ... Goronzy, J. J. (2016). Defective T Memory Cell Differentiation after Varicella Zoster Vaccination in Older Individuals. *PLoS Pathogens*, *12*(10), e1005892. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005892

Reeves, M., & Sinclair, J. (2008). Aspects of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. T. E. Shenk & M. F. Stinski (Toim), *Human Cytomegalovirus* (lk 297–313). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_17

Romero, P., Zippelius, A., Kurth, I., Pittet, M. J., Touvrey, C., Iancu, E. M., Corthesy, P., Devevre, E., Speiser, D. E., & Rufer, N. (2007). Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8+ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *178*(7), 4112–4119. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4112

Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, *22*(1), 745–763. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, *401*(6754), 708–712. https://doi.org/10.1038/44385

Salumets, A., Tserel, L., Rumm, A. P., Türk, L., Kingo, K., Saks, K., Oras, A., Uibo, R., Tamm, R., Peterson, H., Kisand, K., & Peterson, P. (2022). Epigenetic quantification of immunosenescent CD8+ TEMRA cells in human blood. *Aging Cell*, *21*(5), e13607. https://doi.org/10.1111/acel.13607

Sauce, D., Almeida, J. R., Larsen, M., Haro, L., Autran, B., Freeman, G. J., & Appay, V. (2007). PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS (London, England)*, *21*(15), 2005–2013. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282eee548

Seddon, B., & Yates, A. J. (2018). The natural history of naive T cells from birth to maturity. *Immunological Reviews*, *285*(1), 218–232. https://doi.org/10.1111/imr.12694

Sekine, T., Perez-Potti, A., Nguyen, S., … Buggert, M. (2020). TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8 $^{+}$ T cells. *Science Immunology*, *5*(49), eaba7918. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba7918

Serrano-Villar, S., Sainz, T., Lee, S. A., … Deeks, S. G. (2014). HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and

mortality. *PLoS Pathogens*, *10*(5), e1004078. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004078

Sissons, J. G. P., & Wills, M. R. (2015). How understanding immunology contributes to managing CMV disease in immunosuppressed patients: Now and in future. *Medical Microbiology and Immunology*, *204*(3), 307–316. https://doi.org/10.1007/s00430-015-0415-0

Solana, R., Tarazona, R., Gayoso, I., Lesur, O., Dupuis, G., & Fulop, T. (2012). Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in Immunology*, *24*(5), 331–341. https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.008

Spyridopoulos, I., Martin-Ruiz, C., Hilkens, C., Yadegarfar, M. E., Isaacs, J., Jagger, C., Kirkwood, T., & von Zglinicki, T. (2016). CMV seropositivity and T-cell senescence predict increased cardiovascular mortality in octogenarians: Results from the Newcastle 85+ study. *Aging Cell*, *15*(2), 389–392. https://doi.org/10.1111/acel.12430

Strindhall, J., Skog, M., Ernerudh, J., Bengner, M., Löfgren, S., Matussek, A., Nilsson, B. O., & Wikby, A. (2013). The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: The Swedish HEXA immune study. *Age*, *35*(3), 985–991. https://doi.org/10.1007/s11357-012-9400-3

Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., ... Picker, L. J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(5), 673–685. https://doi.org/10.1084/jem.20050882

Zhang, H., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2021). Hallmarks of the aging T-cell system. *The FEBS Journal*. https://doi.org/10.1111/febs.15770

Takata, H., & Takiguchi, M. (2006). Three Memory Subsets of Human CD8+ T Cells Differently Expressing Three Cytolytic Effector Molecules. *The Journal of Immunology*, *177*(7), 4330–4340. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4330

Tarazona, R., DelaRosa, O., Alonso, C., Ostos, B., Espejo, J., Peña, J., & Solana, R. (2000). Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, *121*(1–3), 77–88. https://doi.org/10.1016/s0047-6374(00)00199-8

Thapa, P., & Farber, D. L. (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thoracic Surgery Clinics*, *29*(2), 123–131. https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001

van den Berg, S. P. H., Pardieck, I. N., Lanfermeijer, J., Sauce, D., Klenerman, P., van Baarle, D., & Arens, R. (2019). The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Medical Microbiology and Immunology*, *208*(3), 365–373. https://doi.org/10.1007/s00430-019-00608-7

van den Berg, S. P. H., Wong, A., Hendriks, M., Jacobi, R. H. J., van Baarle, D., & Van Beek, J. (2018). Negative effect of age, but not of latent cytomegalovirus infection on the antibody response to a novel influenza vaccine strain in healthy adults. *Frontiers in Immunology*, *9*(JAN). Scopus. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00082

van der Geest, K. S. M., Abdulahad, W. H., Teteloshvili, N., ... Boots, A. M. H. (2015). Low-affinity TCR engagement drives IL-2-dependent post-thymic maintenance of naive CD4+ T cells in aged humans. *Aging Cell*, *14*(5), 744–753. https://doi.org/10.1111/acel.12353

van Duin, D., Mohanty, S., Thomas, V., Ginter, S., Montgomery, R. R., Fikrig, E., Allore, H. G., Medzhitov, R., & Shaw, A. C. (2007). Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(2), 970–975. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.970

van Lier, R. A. W., ten Berge, I. J. M., & Gamadia, L. E. (2003). Human CD8+ T-cell differentiation in response to viruses. *Nature Reviews Immunology*, *3*(12), 931–939. https://doi.org/10.1038/nri1254

Voehringer, D., Koschella, M., & Pircher, H. (2002). Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood*, *100*(10), 3698–3702. https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0657

Waller, E. C. P., McKinney, N., Hicks, R., Carmichael, A. J., Sissons, J. G. P., & Wills, M. R. (2007). Differential costimulation through CD137 (4–1BB) restores proliferation of human virus-specific "effector memory" (CD28− CD45RAHI) CD8+ T cells. *Blood*, *110*(13), 4360–4366. https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-104604

Weng, N., Araki, Y., & Subedi, K. (2012). The molecular basis of the memory T cell response: Differential gene expression and its epigenetic regulation. *Nature reviews. Immunology*, *12*(4), 306–315. https://doi.org/10.1038/nri3173

Weng, N.-P., Akbar, A. N., & Goronzy, J. (2009). CD28(-) T cells: Their role in the age-associated decline of immune function. *Trends in Immunology*, *30*(7), 306–312. https://doi.org/10.1016/j.it.2009.03.013

Wertheimer, A. M., Bennett, M. S., Park, B., Uhrlaub, J. L., Martinez, C., Pulko, V., Currier, N. L., Nikolich-Žugich, D., Kaye, J., & Nikolich-Žugich, J. (2014). Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *192*(5), 2143–2155. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301721

Wikby, A., Månsson, I. A., Johansson, B., Strindhall, J., & Nilsson, S. E. (2008). The immune risk profile is associated with age and gender: Findings from three Swedish population studies of individuals 20–100 years of age. *Biogerontology*, *9*(5), 299–308. https://doi.org/10.1007/s10522-008-9138-6

Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J. G., & Carmichael, A. J. (2002). Identification of Naive or Antigen-Experienced Human CD8+ T Cells by Expression of Costimulation and Chemokine Receptors: Analysis of the Human Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cell Response. *The Journal of Immunology*, *168*(11), 5455–5464. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5455

Xu, W., & Larbi, A. (2017). Markers of T Cell Senescence in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8), 1742. https://doi.org/10.3390/ijms18081742

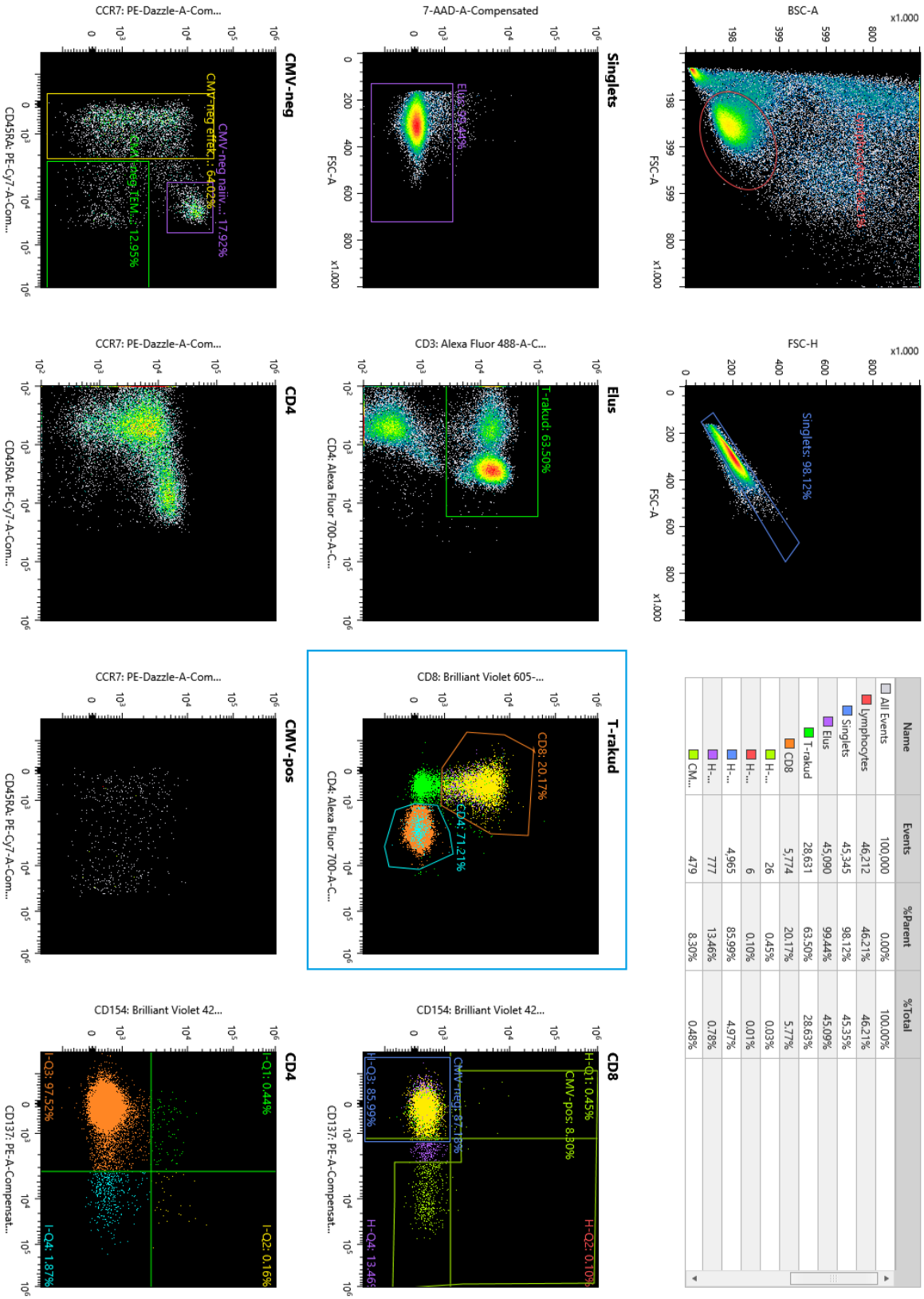
Yan, C., Xu, Z., & Huang, W. (2021). Cellular Senescence Affects Cardiac Regeneration and Repair in Ischemic Heart Disease. *Aging and Disease*, *12*(2), 552–569. https://doi.org/10.14336/AD.2020.0811

Yao, C., Lou, G., Sun, H.-W., … Wu, T. (2021). BACH2 enforces the transcriptional and epigenetic programs of stem-like CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *22*(3), 370–380. https://doi.org/10.1038/s41590-021-00868-7

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134

Yigit, B., Wang, N., Ten Hacken, E., ... Terhorst, C. (2019). SLAMF6 as a Regulator of Exhausted CD8+ T Cells in Cancer. *Cancer Immunology Research*, *7*(9), 1485–1496. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0664

LISAD



Lisa 1. Voolutsütomeetrilise rakusortimise graafilised tulemused.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liisa-Miina Pilv,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Geeniekspressioon 65-aastaste ja vanemate indiviidide CD8+ TEMRA ning CD8+ CMV-spetsiifilistes T-rakkudes“, mille juhendajad on Lehte Türk, Liina Tserel ja Viljar Jaks, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

Liisa-Miina Pilv

19.05.2022