

TALLINNA REAALKOOL

ANNA PAULIINA RUMM

136.A REAAL-PROGRAMMEERIMISE ÕPPESUUND

EAKATE INIMESTE TSÜTOMEGALOVIIRUSE-VASTANE IMMUUNVASTUS JA SELLE SEOS PÕLETIKULISTE HAIGUSTEGA

JUHENDAJA PÄRT PETERSON

SISSEJUHATUS

Immuunsüsteemi üks peamisi eesmärgi on kaitsta keha infektsioonide ja väliste haigustekitajate eest, käivitamata seejuures immuunreaktsiooni organismi enda rakkude ja kudede vastu. Immuunsüsteem koosneb mitmetest erinevatest organitest ja rakkudest ning nende omavahelise tasakaalu ja keha üldise homöostaasi säilitamine on efektiivse ja toimiva immuunvastuse tekkimiseks hädavajalik. Kõrvalekalded normaalsest immuunsüsteemi funktsionaalsusest ja kompositsioonist võivad viia märgatava languseni immuunvastuse efektiivsuses.

Vananemisega kaasnevad ulatuslikud muutused erinevate immuunsüsteemi rakkude osakaalus, fenotüübis ja funktsionaalsuses. Need muutused on tihedalt seotud oluliselt nõrgema organismi vastupanuvõimega ja selle tulemusel on eakad inimesed vastuvõtlikumad nakkushaigustele, nende immuunvastus vaktsiinidele on nõrgem ning kasvajakude tuvastamine on ebaefektiivsem. Sellised kõrvalekalded on suurel määral otseselt või kaudselt tingitud vanusega seotud tühimuse taandarengust, kuid on teada, et mõned herpesviirused, peamiselt tsütomegaloviirus (CMV), põhjustavad ja kiirendavad märgatavalt nende muutuste tekkimist ja edasist progresseerumist. Missuguste mehhanismide kaudu CMV immuunrakkude fenotüüpi ja funktsionaalsust mõjutab ning kuidas on see seotud erinevate vananemisele iseloomulike haiguste ja nende patoloogiaga ei ole aga täpselt teada.

Siinse töö eesmärk oli uurida, kas ja kuidas on eakates inimestes kroonilised põletikulised haigused seotud CMV-vastaste antikehadega ning mil viisil mõjutavad vanus ja sugu nende antikehade taset.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
KASUTATUD LÜHENDID	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Immuunsüsteem.....	7
1.1.1. Immuunsüsteemi osad.....	7
1.1.2. Kaasasündinud ja omandatud immuunsus	8
1.1.3. T- ja B-lümfotsüüdid.....	8
1.2. Immuunsüsteem ja vananemine	10
1.2.1. Muutused T-rakkude populatsioonis ja funktsionaalsuses.....	11
1.2.2. Seos infektsioonide, autoimmunhaiguste ja kasvajatega	12
1.3. Herpesviirused	14
1.4. Tsütomegaloviirus	15
1.4.1. CMV infektsioonitsükkel.....	16
1.4.2. CMV glükoproteiinid ja tegumendivalgud	17
1.5. CMV-vastane immuunvastus ja selle seos vananemisega	18
1.5.1. Muutused T-lümfotsüütides.....	18
1.5.2. Seos vananemisega seotud haigustega	20
1.6. Lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1. Töö eesmärgid	24
2.2. Materjal ja metoodika	24
2.2.1. Valimi iseloomustus	24
2.2.2. Kasutatud praimerid.....	25
2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon ja restriksioonreaktsioon.....	25
2.2.4. Ligatsioon ja transformatsioon	26
2.2.5. Plasmiidse DNA mini- ja midipreparatsioon	27
2.2.6. Rakukultuur	27
2.2.7. Transfektsioon	28
2.2.8. ELISA	28
2.2.9. LIPS.....	29
2.2.10. T-rakkude stimulatsioonist ja sortimine	29
2.2.11. Andmeanalüüs.....	31
3. TULEMUSED	32
3.1. LIPS võimaldab hinnata CMV-spetsiifiliste antikehade taset seerumis	32
3.2. pp150-d2 on sobiv antigeen CMV-seropositiivsuse määramiseks	33
3.3. CMV-seropositiivsete inimeste antikehad ei ole suunatud kindla pp150-d2 regiooni vastu	35

3.4.	LIPS on kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkusega kvalitatiivne test.....	36
3.5.	CMV-vastaste antikehade tiitrid tõusevad vanusega	37
3.6.	Haiguslikud seisundid soodustavad CMV-vastaste antikehastiitrite tõusu vananemisel.....	40
3.7.	Kroonilisi põletikulisi haiguseid põdevatel inimestel on kõrgem CMV-vastaste antikehade tiiter.....	43
3.8.	Kõrged CMV-vastaste antikehade tiitrid on seotud tugevama rakulise immuunvastusega.....	45
4.	ARUTELU	47
	KOKKUVÕTE	51
	RESÜMEE.....	52
	TÄNUSÕNAD	53
	KASUTATUD ALLIKAD	54
	LISA 1. Uuritavad haigusrühmad	67
	LISA 2. pp150-d2.1 ja pp150-d2.2 plasmiidid.....	68
	LISA 3. ROC-analüüsi graafikud pp150-d1 ja pp150-d2 jaoks	69
	ABSTRACT	70

KASUTATUD LÜHENDID

APC	antigeeni presenteeriv rakk (<i>antigen presenting cell</i>)
7-AAD	7-aminoaktinomütsiin D (<i>7-aminoactinomycin D</i>)
AUC	graafikualune pindala (<i>area under the curve</i>)
BCR	B-raku retseptor (<i>B-cell receptor</i>)
CD	diferentseerumise klaster (<i>cluster of differentiation</i>)
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMV	tsütomegaloviirus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetüülsulfoksiid (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
EBV	Epstein-Barri viirus (<i>Epstein-Barr virus</i>)
EDTA	etüleendiamiintetra-äädikhape (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	immunoensüümanalüüs (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESRD	lõppstaadiumi neerupuudulikkus (<i>end stage renal disease</i>)
FACS	fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FcR	antikeha Fc-otsaga seonduv retseptor (<i>immunoglobulin Fc fragment binding receptor</i>)
GLM	üldistatud lineaarne mudel (<i>generalized linear model</i>)
HbA1c	hemoglobiin A1c (<i>hemoglobin A1c</i>)
HCV	C-hepatiidi viirus (<i>hepatovirus C</i>)
HEK293	inimese embrüonaalsed neerurakud (<i>human embryonic kidney 293 cells</i>)
HHV	inimese herpesviirus (<i>human herpesvirus</i>)
HIV	inimese immuunpuudulikkuse viirus (<i>human immunodeficiency viruses</i>)

HLA-DR	inimese leukotsüüdi antigeeni DR-isotüüp (<i>human leukocyte antigen DR isotype</i>)
HSV	Herpes simplex viirus (<i>herpes simplex virus</i>)
HT	autoimmuunne hüpotüreoidism (<i>Hashimoto thyroiditis</i>)
HTLV-1	inimese T-lümfotroopne viirus 1 (<i>human T-lymphotropic virus 1</i>)
IEG	<i>Immediate early genes</i>
IFN	interferoon (<i>interferon</i>)
IL	interleukiin (<i>interleukin</i>)
KLRG1	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G</i>
LIPS	lutsiferaasil põhinev immuunsadestamine (<i>luciferase immunoprecipitation system</i>)
LUNA	<i>Latency unique natural antigen</i>
MERS-CoV	respiratoorse sündroomiga lähisida koroonaviirus (<i>Middle East respiratory syndrome-related coronavirus</i>)
MHC	peamine koesobivuskompleks (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIE	peamised IE-geenid (<i>major IE genes</i>)
MIEP	<i>The major immediate early promoter</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-rakk	loomulik tapjarakk (<i>natural killer cell</i>)
NPV	negatiivne ennustamise väärtus (<i>negative predictive value</i>)
ORF	avatud lugemisraam (<i>open reading frame</i>)
PBMC	perifeerse vere mononukleaarsed rakud (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	fosfaadiga puhverdatud soolalahus (<i>phosphate buffered saline</i>)
PPV	positiivne ennustamise väärtus (<i>positive predictive value</i>)
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>

T2D	2. tüüpi diabeet (<i>type 2 diabetes</i>)
T _{CM}	peamiselt sekundaarsetes lümfoïdorganites asuvad CD45RO ⁺ tsütotoksilise ja proliferatiivse võimega T-mälurakud (<i>central memory T cells</i>)
TCR	T-raku retseptor (<i>T-cell receptor</i>)
T _{EF}	T-efektorrakk (<i>effector T cell</i>), mis on antigeenispetsiifiline ja osaleb aktiivselt patogeeni elimineerimisel
T _{EM}	T-efektormälurakud (<i>effector memory T cells</i>), mis ekspresseerivad CD8-t ja osalevad tänu oma tsütotoksilisusele patogeenvastases kaitses
T _{EMRA}	lõplikult diferentseerunud CD8 ⁺ efektor-mälu T-rakud, mis taasekspresseerivad CD45RA-d (<i>terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA</i>)
T _H	CD4 ⁺ T-abistajarakk (<i>T-helper cell</i>), mis aitab aktiveerida teisi immuunrakke
TLR	tolli-laadne retseptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TMB	3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin (<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>)
T _N	naiivne T-rakk (<i>naive T cell</i>), mis ei ole varem antigeeniga kokku puutunud
TNF	tuumori nekroosi faktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
UL	<i>The unique long region</i>
US	<i>The unique short region</i>
VZV	Varicella-zoster viirus (<i>varicella-zoster virus</i>)

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Immuunsüsteem

Immuunsüsteemi esmane ülesanne on kaitsta organismi infektsioonide eest. Immuunvastus tekitab enamasti kehvälise haigustekitajate, toksiinide või kasvajaklike rakkude vastu, kuid teatud juhtudel algatatakse seda ka ilma kehvälise stiimulita. Seetõttu tuleks immuunvastus defineerida kui igasugune reaktsioon patogeene, kuid ka makromolekulide ja väikeste keemiliste ühendite vastu, mille keha peab võõraks, seejuures hoolimata, mis on sellise reaktsiooni füsioloogiline või patoloogiline tagajärg. (Abbas *et al.*, 2017)

1.1.1. Immuunsüsteemi osad

Immuunsüsteemi organid võib jagada kaheks: primaarsed ja sekundaarsed lümfoidorganid. Primaarsed lümfoidorganid on luuüdi ja tüümus – nendes elundites hakkavad lümfotsüüdid esimest korda ekspresseerima antigeenireseptoreid ja saavutavad fenotüübilise ja funktsionaalse küpsuse. Tüümus on kahesagaraline elund, mis asub inimesel eesmisel keskseinandis ja hakkab peale puberteeti taandarenema. Tüümuses toimub T-rakkude küpsemine ja seetõttu on selle välimisse kooreosasse koondunud suur hulk arengu varasemas faasis olevaid T-lümfotsüüte, mida sisemises säsiosas on oluliselt vähem. T-rakkude küpsemises on oluline roll tüümuse säsi epiteelirakkudel, sest need esitlevad arenevatele T-rakkudele autoantigene ehk kehaomaseid valke ja kõrvaldavad lümfotsüüdid, mis need ära tunnevad. Sellega tagatakse, et immuunsüsteem ei reageeri keha enda kudede vastu. Luuüdis toimub B-rakkude küpsemine ja täiskasvanud inimesel ka hematopoiesis ehk vererakkude tootmine. Punased vererakud, granulotsüüdid, monotsüüdid, dendriitrakud, nuumrakud, trombotsüüdid ning B- ja T-lümfotsüüdid pärinevad ühisest vereloometüvirakust luuüdis. (Abbas *et al.*, 2017)

Sekundaarsed lümfoidorganid on lümfisõlmed, põrn ja immuunsüsteemi komponendid limaskestadel. Need organid algatavad lümfotsüütide immuunvastuse võõrastele antigeenidele. Lümfisüsteem kannab antigeenid lümfisõlmedesse ja seal stimuleerivad need omandatud immuunsüsteemi vastust. Seetõttu on lümfisõlmedesse koondunud suur hulk B- ja T-lümfotsüüte. Põrna peamine ülesanne on eemaldada vanad ja kahjustatud vererakud ringlusest ja algatada omandatud immuunsüsteemi vastust veres olevate antigeenide vastu. (Abbas *et al.*, 2017)

1.1.2. Kaasasündinud ja omandatud immuunsus

Esmast kaitset haigustekitajate ja võõraste makromolekulide vastu vahendab kaasasündinud immuunsüsteem ning hilist omandatud immuunsüsteem. Kaasasündinud immuunsus põhjustab varast ja kiiret immuunvastust mikroobide ja vigastatud rakkude vastu, kasutades rakulisi ja biokeemilisi mehhanisme, mis on kehas olemas juba enne infektsiooni. Selle peamised komponendid on füüsilised ja keemilised barjäärid, õgirakud ehk fagotsüüdid (neutrofiilid ja makrofaagid), dendriitrakud, nuumrakud, NK-rakud ja valgud, mis soodustavad põletiku tekkimist. Erinevalt omandatud immuunsusest, reageerib kaasasündinud immuunsüsteem ka korduval kokkupuutel stiimuliga samamoodi ja on märgatavalt ebaspetsiifilisem. (Abbas *et al.*, 2017)

Omandatud immuunsüsteemi vastust vahendavad peamiselt lümfotsüüdid ja nende toodetud molekulid. Eristatakse T- ja B-lümfotsüüte, mis täidavad immuunvastuse käivitamisel ja progressioonil eri ülesandeid. Lümfotsüüdid ekspresseerivad suures koguses erinevaid retseptoreid ja suudavad seetõttu ära tunda väga erinevaid antigeene, millega organism võib kokku puutuda. Tänu sellele on omandatud immuunsüsteem kõrge spetsiifilisuse ja mitmekesisusega. Ühtlasi on sellele iseloomulik immunoloogiline mälu, mida vahendavad T- ja B-lümfotsüütide alampopulatsioonide mälurakud. See tähendab, et eelnev immuunvastus tõhustab rakulist immuunreaktsiooni korduval kokkupuutel sama antigeeniga. (Abbas *et al.*, 2017)

1.1.3. T- ja B-lümfotsüüdid

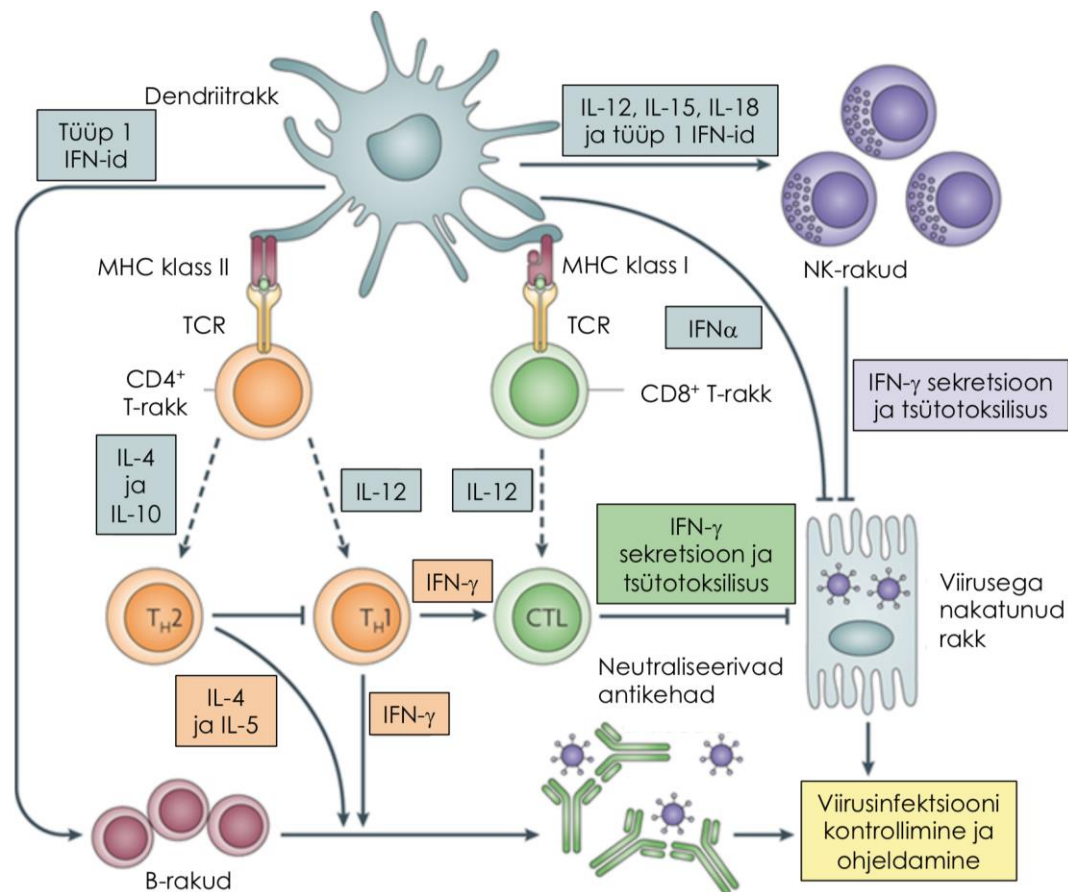
T- ja B-lümfotsüüdid on peamised omandatud immuunvastuse vahendajad. Lümfotsüütide spetsiifilisus ja mitmekesisus saavutatakse tänu suurele arvule erinevatele T- ja B-rakukloonidele (igas inimeses suurusjärgus 10^8 – 10^{10}), millest igaüks kannab ühte kindlat T- või B-raku retseptorit (vastavalt TCR ja BCR), mis seondub antigeeniga. (LaRosa, Orange, 2008; Lythe *et al.*, 2016) T- ja B-rakkude erinevate retseptorite kogumit nimetatakse repertuaariks.

Omandatud immuunvastuse algusjärgus on kindlat antigeeni äratundvaid T-rakke vähe ning esmalt toimub selle väikese rakupopulatsiooni ulatuslik klonaalne jagunemine. Suurenenud populatsioonis on toimunud erinevad fenotüübilised muutused, mis võimaldavad lümfotsüütidel täita patogeenvastaseid efektorfunktsioone ja toetada immunoloogilise mälu kujunemist (Bucholz *et al.*, 2016). T-rakkude retseptorid tunnevad ära peptiidid, mida esitlevad antigeeni presenteerivad rakud (ingl *antigen presenting cell*; APC), näiteks dendriitrakud, B-rakud ja makrofaagid, nende pinnal oleva peamise koosobivuskompleksi abil (ingl *major*

histocompatibility complex; MHC) (Malissen, Bongrand, 2015; Abbas *et al.*, 2017). Kui TCR seondub edukalt talle esitletava antigeeniga, saadetakse signaal rakumembraanil asuva TCR-i kompleksi kaudu rakku, mis algatab rakusisese signalisatsioonikaskaadi ja viib efektiivse immuunvastuseni (Rossjohn *et al.*, 2015).

Kaks suuremat T-rakkude populatsiooni on CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakud. CD4⁺ T-lümfotsüüdid ehk T-abistaja (T_H) rakud aktiveerivad teisi immuunsüsteemi rakke, mis on olulised organismi kaitses, aitavad B-lümfotsüütidel toota kõrge afiinsusega antikehasid ja soodustavad CD8⁺ T-rakkude arengut (joonis 1). CD8⁺ T-lümfotsüütide peamine ülesanne on kõrvaldada rakusisese infektsiooniga keharakke. Seandumisel nakatunud rakuga kannab CD8⁺ lümfotsüüt tsütotoksilised valgud, näiteks perforiini ja gransüümi, peremeesrakku, kus need initsieerivad rakusurma. (Abbas *et al.*, 2017)

Humoraalset immuunsust, mis vastutab rakuväliste mikroobide ja toksiinide vastase kaitse eest, vahendavad B-lümfotsüütide toodetud antikehad. B-rakkude aktivatsioon võib toimuda nii T-rakkude abiga kui ka ilma. Kokkupuutes mikroobset päritolu mittevalgulistega aktiveeritakse B-lümfotsüüdid T-rakkudest sõltumatult, kuid valgulise antigeeni indutseeritud aktivatsiooni jaoks peab B-rakk esitlema antigeeni esmalt T_H-lümfotsüüdile, mis seejärel aktiveerib B-raku (joonis 1). Nagu ka T-rakkude puhul, järgneb aktivatsioonile kindlate B-lümfotsüüdi kloonide ulatuslik jagunemine. Peale seda diferentseeruvad B-lümfotsüüdid kas antikehasid sekreteerivateks plasmarakkudeks või B-mälurakkudeks. Tänu mälurakkudele on omandatud immuunvastus korduval kokkupuutel patogeeni tugevam ja kiirem kui esmakordsel kokkupuutel. (Abbas *et al.*, 2017)



Joonis 1. Erinevate immuunsüsteemi rakkude roll immuunvastuse tekkimisel viirusinfektsiooni näitel. Antigeeni presenteerv rakk, siin joonisel dendriitrakk, aktiveerib nii CD8⁺ kui ka CD4⁺ T-rakud, mis omakorda diferentseeruvad vastavalt CD8⁺ T-efektorrakkudeks (T_{EF}) (ingl *cytotoxic T cell*; CTL) ja T_H -rakkudeks. Samuti stimuleerib dendriitrakk NK-rakkude viirusinfektsioonivastast immuunvastust. Immuunvastuse tekkimisel mängivad olulist rolli ka B-rakkude toodetud antikehad. Rakkudevahelises suhtluses ja diferentseerumises mängivad olulist rolli mitmed tsütokiinid, nagu interferoonid ja interleukiinid. (Lambotin *et al.*, 2014 (kohandatud))

1.2. Immuunsüsteem ja vananemine

Vananedes toimuvad immuunsüsteemis ulatuslikud muutused, millest suuremat osa peetakse organismile kahjulikuks. Nende muutuste tulemusel on vanadel inimestel tõusnud risk haigestuda nakkushaigustesse, nõrgenenud immuunvastus vaktsiinidele, ebaefektiivne mälurakkude reaktsioon, autoimmuunhaiguste kõrgem esinemissagedus ja krooniline põletik ehk inflamatsioon. (Fülöp *et al.*, 2018a; Goronzy, Weyand, 2013)

Vananemine mõjutab tugevasti kaasasündinud immuunsust: makrofaagidel on madalam fagotsütootiline aktiivsus ja MHC-II ekspressioon, dendriitrakud esitlevad väiksemas koguses antigeene ning neil on vähem CD80 ja CD86 pinnaretseptoreid, mis on vajalikud naiivsete T-

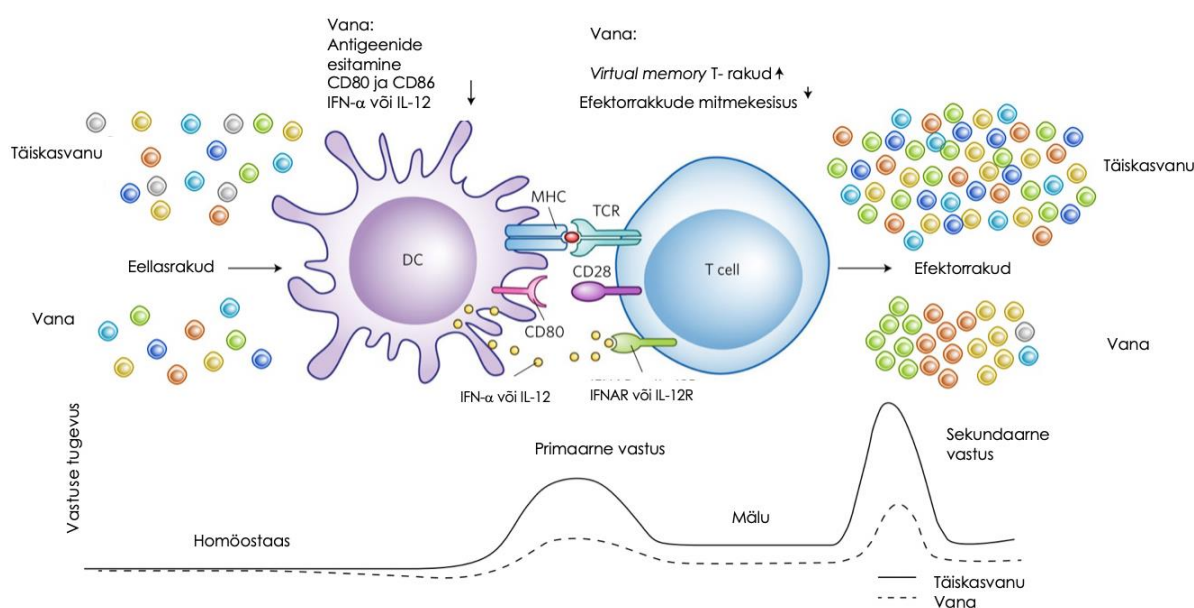
rakkude (T_N) aktiveerimiseks. Lisaks on nii neutrofiilidel, makrofaagidel kui ka dendriitrakkudel vähem Tolli-laadseid retseptoreid (ingl *Toll-like receptors*; TLR), millel on oluline roll kaitses mikroobsete nakkuste vastu. (Nikolich-Zugich, 2018; Abbas *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2019) Vananemisega seotud organukahjustusi on seostatud neutrofiilide ebatäpsema kemotaksisega – vananenud neutrofiilid liiguvad põletikukoldest ebavajalikult kaugemale ja nende sekreteeritav proteinaas põhjustab ulatuslikke kahjustusi tervetes kudedes (Sapey *et al.*, 2014). Ühtlasi muudab vananemine nii T- kui ka B-rakkude populatsiooni ja funktsionaalsust – iseloomulik on madalam B-rakkude arv ja osakaal immuunrakupopulatsioonis ning olemasolevad B-rakud toodavad vähem antikehasid kui noortel inimestel (Frasca *et al.*, 2008).

1.2.1. Muutused T-rakkude populatsioonis ja funktsionaalsuses

Üks drastilisemaid vananemisega seotud muutuseid immuunsüsteemis on tüümuse involutsioon ehk taandarenemine, mille tulemusel muutub tüümus mõõtnetelt väiksemaks (Abbas *et al.*, 2017). Sellega kaasnevad mitmed funktsionaalsed kõrvalekalded: toodetakse vähem naiivseid T-rakke, perifeerne rakupopulatsioon lakkab uuenevast ja langeb immuunvastuse efektiivsus (Nikolich-Zugich, 2014; Fülöp *et al.*, 2016; LaMaoult *et al.*, 2000). Osaliselt tasakaalustab seda T_N -lümfootsüütide perifeerne homöostaatiline proliferatsioon, mis on keha loomulik protsess, et säilitada püsiv T-rakkude arv (Fülöp *et al.*, 2018a; Moxham *et al.*, 2008). Vananemisele iseloomulikud muutused T-rakkudes on tingitud peamiselt kehvast perifeersest T-lümfootsüütide ülalhoiust, ulatuslikust mälurakkudeks diferentseerumisest ja populatsiooni klonaalsetest paisumisest (Pulko *et al.*, 2016). Vananemisel on väga iseloomulik T_N -rakkude hulga ja mitmekesisuse vähenemine. See mõjutab $CD8^+$ T_N rakupopulatsiooni märgatavalt tugevamini kui $CD4^+$ T_N oma, kuid ühest selgitust sellele erinevusele ei ole leitud. (Wertheimer *et al.*, 2014) Vanadel inimestel on enamasti oluliselt kõrgem suhteline T_M -rakkude arv ja suurem $CD45RA^+$ T-efektormälurakkude (T_{EMRA}) populatsioon (Goronzy, Weyand, 2017). T_{EMRA} -d on lõpuni diferentseerunud mälurakud, mis on spetsiifilised peamiselt latentsete viirusnakkuste suhtes ja seetõttu pole nende akumulatsioon nii ulatuslik inimestel, kellel pole näiteks Epstein-Barri viirust (EBV) või CMV-d, mis on ühed levinuimad latentset nakkust põhjustavad viirused (Goronzy, Weyand, 2017; Verma *et al.*, 2017; Winter *et al.*, 2019). CMV-negatiivsetel inimestel on vanusega oluliselt tõusnud nii $CD8^+$ T-efektormälurakkude (T_{EM} ; $CD28^{madal}95^{kõrge}$) kui ka $CD8^+$ T_{CM} (ingl *central memory T cells*; $CD28^{kõrge}95^{kõrge}$) rakkude arv (Wertheimer *et al.*, 2014). Nagu mälurakkude hulk, tõuseb vananedes ka reguleerivate T-rakkude arv, mida on seostatud tugevama immunosupressiooni ja nõrgema immuunvastusega vanades inimestes (Raynor *et al.*, 2012).

Vanusega väheneb T-rakkude funktsionaalsus (joonis 2). Neil on vähenenud jagunemisvõime ja diferentseerumist määravate transkriptsioonifaktorite ekspressioon, vigane varajaste

signaalmolekulide tootmine ja teistsugune efektormolekulide ekspressioon. (Jergović *et al.*, 2018) Langu funktsionaalsuses on tugevalt seotud muutustega pinnamolekulide ekspressioonis, mis on olulised rakkude aktiveerimisel ja rakkudevahelises suhtluses. Näiteks suureneb T-rakkude populatsioon, mis ei ekspresseeri CD28-t. See on kriitilise tähtsusega molekul T_N-rakkude normaalseks aktivatsiooniks (Lemster *et al.*, 2008; Esensten *et al.*, 2016). CD4⁺ CD28⁻ T-rakud on ebaefektiivsed B-rakkude aktiveerimisel ja antikehade tootmise indutseerimisel ning CD8⁺ CD28⁻ T-rakkudel on madalam proliferatiivne vastus CD3/TCR stimulatsioonile kui CD28⁺ T-rakkudel (Weyand *et al.*, 1998; Posnett *et al.*, 1994).



Joonis 2. CD8⁺ T-rakkude aktivatsioon vanades inimestes. Vananedes toimuvad muutused nii APC-rakkudes, milleks on antud joonisel dendriitrakk (DC), kui ka näiteks T-rakkudes. Vananedes muutub nii eellasrakkude kui ka T_{EF}-rakkude populatsiooni suurus ja mitmekesisus. Seejuures on eakate inimeste immuunvastus oluliselt nõrgem kui noortel. (Nikolich-Žugich, 2018 (kohandatud))

Eakatel inimestel on oluliselt vähenenud TCR-repertuaari mitmekesisus, sest kaks kuni neli dominantset T-raku klooni võivad hõlmata isegi kuni 50–80% repertuaarist (Nikolich-Žugich, 2018). Seetõttu ei suuda immuunsüsteem enam teiste patogeenidega võidelda ja homöostaatiliste mehhanismide tõttu võib repertuaari mitmekesisust veelgi vähendada (LeMaout *et al.*, 2000).

1.2.2. Seos infektsioonide, autoimmuunhaiguste ja kasvajatega

Kuna vanade inimeste üldine immuunvastus pole nii tõhus, T-rakkude funktsionaalsus on langenud ja TCR-repertuaari mitmekesisuse on väiksem, on nad märgatavalt vastuvõtlikumad nakkushaigustele ja nende immuunreaktsioon vaktsiinidele on nõrgem (Aspinall *et al.*, 2007). Vanade inimeste CD8⁺ T-rakkude proliferatiivne vastus ja toodetav IFN-γ kogus gripivaktsiinile

on madalamad kui noortel (Deng *et al.*, 2004). IFN- γ on oluline peamiselt makrofaagide aktiveerimiseks (Abbas *et al.*, 2011). Pikemate telomeeridega T- ja B-rakkude immuunreaktsioon sellele vaktsiinile on märkimisväärselt tugevam ja efektiivsem kui vastavatel rakkudel lühemate telomeeridega, mis on iseloomulikud vananenud T- ja B-lümfotsüütidele (Najarro *et al.*, 2015; Son *et al.*, 2000). Kehvem immuunvastus vaktsiinidele on juba iseenesest põhjus, miks vanadel inimestel esineb rohkem ja sagedamini nakkushaiguseid, kuid suurem risk nakatuda näiteks grippi on suuresti tingitud vigasest omandatud immuunsuse regulatsioonist (Crooke *et al.*, 2019).

Immuunsüsteemi vananemine on seotud autoimmuunhaiguste sagedasema esinemisega vanades inimestes. Autoimmuunhaigused tekivad, kui T- ja B-mälurakud reageerivad kehas leiduvate molekulide ja valkude vastu. Antikehasid, mis on spetsiifilised keha enda kudede suhtes, kutsutakse seetõttu autoantikehadeks (Abbas *et al.*, 2017). Perifeerne T-rakkude autoproliferatsioon võib viia T-rakkude enneaegse küpsemiseni ja autoimmuunsuse ning vananemisega seotud kõrvalekalleteeni T-rakkude alampopulatsioonides (Mackall *et al.*, 1996; Grolleau-Julius *et al.*, 2010; Goronzy, Weyand, 2003). Autoproliferatsioon on T-rakkude ulatuslik jagunemine, mis toimub ilma kehavälise patogeeni või antigeeni otsese stimulatsioonita (Surh, Sprent, 2000). Ühe väljapakutud teooria järgi suurendab perifeersete T-rakkude autoproliferatsioon tõenäosust, et selekteeritakse välja T-rakud, mis tunnevad ära keha enda antigeene. Kõrgemat autoimmuunhaiguste esinemissagedust seostatakse ka immuunsüsteemi vananemisele iseloomuliku kroonilise põletikuga. (Goronzy, Weyand, 2012) Vanuselise T-rakkude DNA demetüleerimise tulemusel toimuvad autoimmuunhaiguste patogeneesile olulised muutused T-rakkude funktsionaalsuses ja geeniekspressioonis ning seetõttu võivad nende haiguste tekkimist soodustada ka epigeneetilised erinevused (Lu *et al.*, 2002; Grolleau-Julius *et al.*, 2010). Näiteks on välja pakutud, et teatud regiooni geenide demetülatsioon võib mängida rolli luupuse patogeneesis (Lu *et al.*, 2002).

Kasvajate tekketõenäosus hakkab koos vanusega oluliselt tõusma (Campisi, 2013). Üks võimalik viis kasvajate arenguks on geneetiliste muutuste tagajärjel toimuv neoantigeenide teke. Need on antigeenid, millega immuunsüsteem ei ole varem kokku puutunud. Need tekivad kartsinogeneesi jooksul kuhjuvate mutatsioonide tulemusel. Kuna vananenud immuunsüsteem pole võimeline uusi antigeene efektiivselt ära tundma, ei suudeta kasvajalikke rakke tuvastada. (Pawelec, 2017) Kasvajate arengut soodustab ka immuunsüsteemi ja rakkude vananemisega seotud krooniline põletik, mis võib põhjustada kasvajate arengut epigeneetiliste mehhanismide kaudu (Fülöp *et al.*, 2018b). Oluline roll on vananenud rakkude akumulierumisel, millele iseloomulik sekretsioonifenotüüp SASP (ingl *senescence-associated secretory phenotype*) loob kasvajate tekkeks immuunsüsteemi

allasuruva mikrokeskkonna ja võib tervetes kudedes soodustada rakkude jagunemist (Campisi, 2013; Nouredine *et al.*, 2011; Capece *et al.*, 2018).

1.3. Herpesviirused

Herpesviirused (*Herpesviridae*) moodustavad suure ja mitmekesise viiruste perekonna, mille võib omakorda jagada α -, β - ja γ -alamperekondadeks replikatsioonimehhanismide, peremeesorganismide, paljunemisviiside ja geneetilise järjestuse sarnasuste põhjal (Sehrawat *et al.*, 2018; Connolly *et al.*, 2011). Neil on kaheaahelaline DNA ja ümbris, millel on oluline roll infektsioonitsükli (Connolly *et al.*, 2011). Rakku sisenemisel ühineb viirusümbris rakumembraaniga. Selle jaoks on herpesviirustel konserveerunud glükoproteiinid gB, gH ja gL (Adler *et al.*, 2006). Seejuures aktiveerib gH-gL heterodimeerne kompleks glükoproteiin B, mis on vajalik viirusümbrise ja membraani liitumiseks (Heldwein, 2016). Teada on kaheksa herpesviiruse liiki, mis nakatavad inimest: *Herpes simplex* viirus (HSV) 1 ja 2, Varicella-zoster viirus (VZV), tsütomegaloviirus (CMV), inimese herpesviirused (HHV) 6, 7 ja 8 ning Epstein-Barri viirus (EBV) (Sehrawat *et al.*, 2018). Suurem osa inimestest on krooniliselt nakatunud ühe või enama herpesviirusega ja arvatakse, et see on võimalik seetõttu, et pikaajalise koossevolutsioneerumise tulemusel on nii peremeesorganismis kui ka viirusgenoomis toimunud kohanduvad muutused (Virgin *et al.*, 2009).

Herpesviiruste pikaaegset ja enamasti kroonilist nakkust võimaldavad erinevad bioloogilised mehhanismid, millest olulisimaks peetakse nende võimet olla vaheldumisi latentses ja lüütilises tsükli (Paludan *et al.*, 2011). Latentse infektsiooni ajal ei toodeta uusi nakkuslikke viiruspartikleid, haigussümptomid puuduvad ja viirus pole võimeline edasi levima (Nicoll *et al.*, 2012). Herpesviirused reaktiveeruvad inimese elu jooksul korduvalt, sisenedes lüütilisse tsükli, kus toimub viiruse replikatsioon ning see viib peremeesraku lüüsimise ja uute rakkude nakatumiseni (Nicoll *et al.*, 2012; Abbas *et al.*, 2017). Enamike herpesviiruste infektsiooniga ei kaasne tõsiseid haiguslikke seisundeid. See võib olla ohtlik vaid väga noortele, vanadele või nõrgenenud immuunsüsteemiga inimestele ning olukorras, kus viiruspartiklid on levinud teatud kehapiirkondadesse, nagu näiteks kesknärvisüsteemi või mõnda teise immuunprivilegeeritud piirkonda (Sehrawat *et al.*, 2018).

1.4. Tsütomegaloviirus

Inimese tsütomegaloviirus (CMV) on β -herpesviirus, mida ümbritseb ikosaeedriline valguline nukleokapsiid (Picarda, Benedict, 2018; Tomitshen III, 2012). Seda katab valkudest koosnev maatriks ehk tegument, kus on suur hulk viirusvalke (Crough, Khanna, 2009). CMV-partikkel on 200–300 nm suur, genoom umbes 240 kb (joonis 3) pikkune ja 165-525 avatud lugemisraamiga (ingl *open reading frame*; ORF) (Crough, Khanna, 2009). CMV-I on kompleksne transkriptoom ning mitu üksteisega kattuvat ORF-i võimaldavad toota erinevaid valke (Stern-Ginossar *et al.*, 2012). CMV genoomset DNA-d võib leida CD14⁺ monotsüütidest, makrofaagidest, lümfotsüütidest, CD34⁺ eellasrakkudest luuüdis, ebaküpsedest dendriitrakkudest ja endoteelirakkudest, kuid seda ei saa üheselt seostada aktiivse infektsiooniga (Crough, Khanna, 2009).

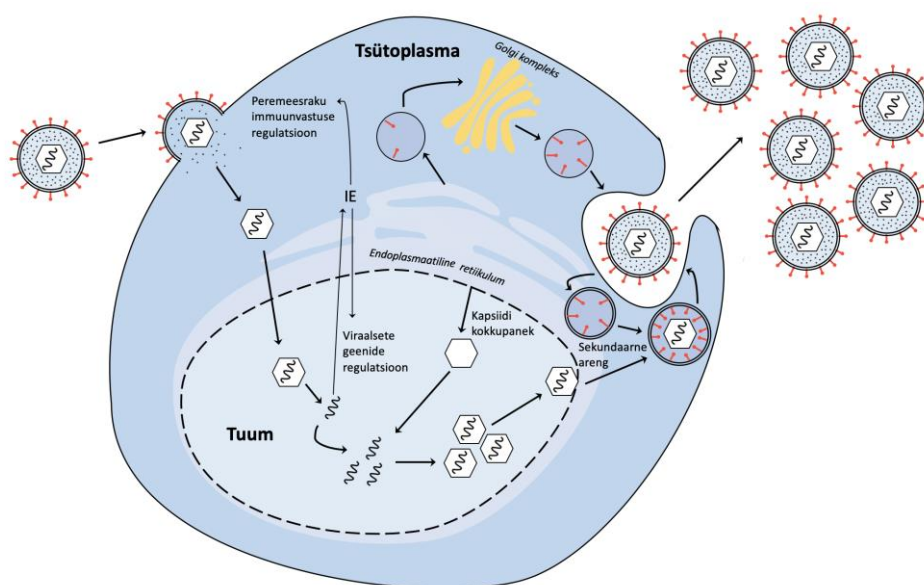


Joonis 3. CMV, VZV, HSV ja EBV genoomide suuruste ja struktuuri võrdlus. TRL (*terminal repeat long*) koosneb suurest arvust kordusjärjestustest. Muud genoomipiirkonnad on UL (*the unique long region*), US (*the unique short region*), IRL (*internal repeat long*), IRS (*internal repeat short*), TRS (*terminal repeat short*) ja IR (*internal repeat*). Jooniselt on näha, et CMV on siin kujutatud herpesviirustest kõige pikema genoomiga. (Crough ja Khanna 2009)

CMV nakkab lüütilises tsükliis ning nakkuslikud viirusosakesed levivad inimeste vahel ja sees kehavedelike kaudu (Cannon *et al.*, 2011). CMV-vastased IgG antikehad on määratavad umbes 60% täiskasvanute veres arenenud maades ja kuni 100% arengumaades (Griffiths *et al.*, 2015). CMV on levinuim kaasasündinud infektsioon: 0,2–2,0% vastsündinutest on sellega nakatunud (Marin *et al.*, 2016). Lüütiline transkriptsiooniprogramm aktiveeritakse, kui latentsed CD34⁺ eellasrakud või CD14⁺ monotsüüdid diferentseeruvad vastavalt dendriitrakkudeks või makrofaagideks (Wills *et al.*, 2015). CMV ellujäämine sõltub viiruse võimest vältida immuunvastust ja selleks on CMV-I välja arenenud mitmed erinevad mehhanismid ning suur hulk viirusvalke, mille ülesanne on maha suruda viirusevastast immuunvastust (Wilkinson *et al.*, 2008).

1.4.1. CMV infektsioonitsükkel

CMV kinnitub nakatatava raku pinnale glükoproteiinide abil ja siseneb rakku endotsütoosi teel. Seitse CMV glükoproteiini on kriitilise tähtsusega rakutropismil: gB, gH, gL, gO, UL128, UL130 ja UL131 (Burke, Heldwein, 2015). Rakku sisenemisel liitub viirusümbris rakumembraaniga, nukleokapsiid lastakse koos tegumendivalgudega rakku ning see liigub tuuma, kus vabastatakse viiruslik DNA, mis indutseerib IE-geenide ekspressiooni (joonis 4; Crough, Khanna, 2009). Mõned tegumendivalgud jäävad tsütoplasmasse, kuid teised, nagu pp65 ja pp71, liiguvad tuuma (Kalejta, 2008). Lüütilise tsükli ajal CMV geenid avalduvad kolmes erinevas faasis: kohene varajane (ingl *immediate early*; IE), varajane ja hiline. Koheses varajases faasis ekspresseeritakse IE-geene, kuhu kuuluvad peamised IE-geenid (ingl *major IE genes*; MIE), milleks on UL123 (IE1) ja UL122 (IE2), ning muud täiendavad geenid. Arvatakse, et IE-geenidel on kriitiline tähtsus, sest need garanteerivad efektiivse CMV replikatsiooni. (Isomura, Stinski, 2003) Uued viirusosakesed pannakse kokku replitseerunud viraalsest DNA-st ja kapsiidist ning need väljuvad rakust eksotsütoosi teel (joonis 4). (Crough, Khanna, 2009)



Joonis 4. CMV infektsioonitsükkel. CMV siseneb rakku endotsütoosi teel ning selle jaoks on vajalik viirusümbrise liitumine rakumembraaniga, milles osalevad viiruse pinnal olevad glükoproteiinid. Viirusosake vabastab nukleokapsiidi, mis kannab viiruse pärilikkusainet, ja see liigub tuuma. Viiruse DNA reguleerib tuumas muuhulgas ka perimeesorganismi immuunvastus. Uued viirusosakesed pannakse kokku replitseerunud DNA-st ja perimeesrakus toodetud kapsiidist. Viiruspartiklid läbivad keerulise kaheetapilise sekundaarse arengu ja väljuvad rakust eksotsütoosi teel. (Crough, Khanna, 2009)

Pärast primaarset infektsiooni on CMV rakkudes latentset. Selles faasis on oluliselt pärssitud lüütilise tsükliga seotud geenide transkriptsioon, sest inhibeeritakse promootorit MIEP (ingl *the major immediate early promoter*). (Sinclair, Reeves, 2013) Latentse CMV-infektsiooni ajal langeb nakatunud inimese rakkudes MHC klass II molekulide arv ja ekspresseeritakse latentsusega seotud geene, nagu UL138, mis vähendavad MIEP-i aktiivsust (Slobedman *et al.*, 2002; Crough, Khanna, 2009; Elder, Sinclair, 2019). Selle promootori all on lisaks geen UL111.5A, mis kodeerib inimese interleukiin-10 (IL-10) homoloogi LAcml-10. See inhibeerib põletikulisi T_H1 tsütokiine (peamiselt $IFN-\gamma$ ja IL-2) ja seega surub maha CMV-vastast immuunvastust (Sinclair, Reeves, 2013; Jenkins *et al.*, 2004). Viiruse geeniproduktid, nagu LUNA ja UL7, mängivad olulist rolli CMV reaktivatsiooni algatamisel, samas mõned geenid, näiteks US28, on tähtsad nii lüütilises kui ka latentsses faasis (Elder, Sinclair, 2019).

Immunokompetentsetel inimestel kulgeb reaktivatsioon enamasti ilma sümptomiteta, kuid sellel on oluline roll viiruse infektsioonitsükli ja see võib tekkida põletiku, muu infektsiooni või stressi tagajärjel (Goronzy, Weyand, 2017; Crough, Khanna, 2009). Stressiga seotud hormoonid, nagu katehhoolamiinid, epinefriin ja norepinefriin, suurendavad lüütilise tsükliga seotud geenide avaldumist, sest stimuleerivad IE-promootorit/enhaanseri (Prösch *et al.*, 2000). IE-regiooni geenide ekspressioon on lüütilise tsükli käivitamisel tähtis, sest nad on vajalikud viraalseks transkriptsiooniks ja replikatsiooniks ning nende valguproduktid reguleerivad varajast ja hilist CMV geenide avaldumist lüütilises tsükli (Grey *et al.*, 2007; Baldick *et al.*, 1997). Selle mehhanismi valguses on reaktivatsioonil oluline tsütokiin $TNF-\alpha$, mis nakatunud rakkude TNF -retseptoriga seondudes aktiveerib transkriptsioonifaktori $NF-\kappa B$ ja proteiinkinaas C, mis omakorda suurendavad CMV IE-regiooni geenide transkriptsiooni ja käivitavad seega lüütilise tsükli. (Crough, Khanna, 2009; Stein *et al.*, 1993)

1.4.2. CMV glükoproteiinid ja tegumendivalgud

CMV antigeene ja pinnamolekule, mida immuunsüsteem ära tunneb, on palju, kuid need ei tekita võrdse tugevusega immuunvastust. Kuus kõige immunogeensemata CMV antigeeni on UL55 (gB), UL83 (pp65), UL86, UL99 (pp28), UL153 ja UL32 (pp150). (Sylwester *et al.*, 2005) CMV ümbrist katvatest glükoproteiinidest on levinuimad gM/gN kompleksid ja gB homodimeerid, mis moodustuvad kahest ühesugusest polüpeptiidist. gB homodimeerid on vajalikud membraanide liitumiseks, kui viirus siseneb rakku. gB seondub rakuvälise heparaansulfaadiga. See on oluline interaktsioon CMV infektsioonitsükli käivitamisel (Compton *et al.*, 1993). gM/gN komplekse on vaja rakule kinnitumiseks ja viraalseks replikatsiooniks (Kari, Gehrz, 1992; Krzyzanniak *et al.*, 2007).

Tegumendis on 50% CMV valkudest, millest levinuim on pp65 (Varnum *et al.*, 2004). pp65 takistab CMV-vastase immuunvastuse tekkimist: vähendab loomulike tapjarakkude (ingl *natural killer cells*; NK-rakud) tsütotoksilisust, inhibeerib IFN- β produktsiooni, takistab IE-valkude esitamist MHC klass I molekulide poolt ja vähendab HLA-DR ekspressiooni (Kalejta, 2008; Arnon *et al.*, 2005; Biolatti *et al.*, 2018; Odeberg *et al.*, 2003). pp71 kontrollib IE-geenide ekspressiooni, vähendab MHC-I molekulide ekspressiooni ja reguleerib rakutsükli ning pp150 kontrollib kapsiidide liikumist tsütoplasmas (Kalejta *et al.*, 2003; Kalejta, 2008). Kõige enam on CMV-vastastest CD8⁺ T-rakkudest selliseid, mis on spetsiifilised pp65 ja IE1 valkude suhtes (Gyulai *et al.*, 2000).

1.5. CMV-vastane immuunvastus ja selle seos vananemisega

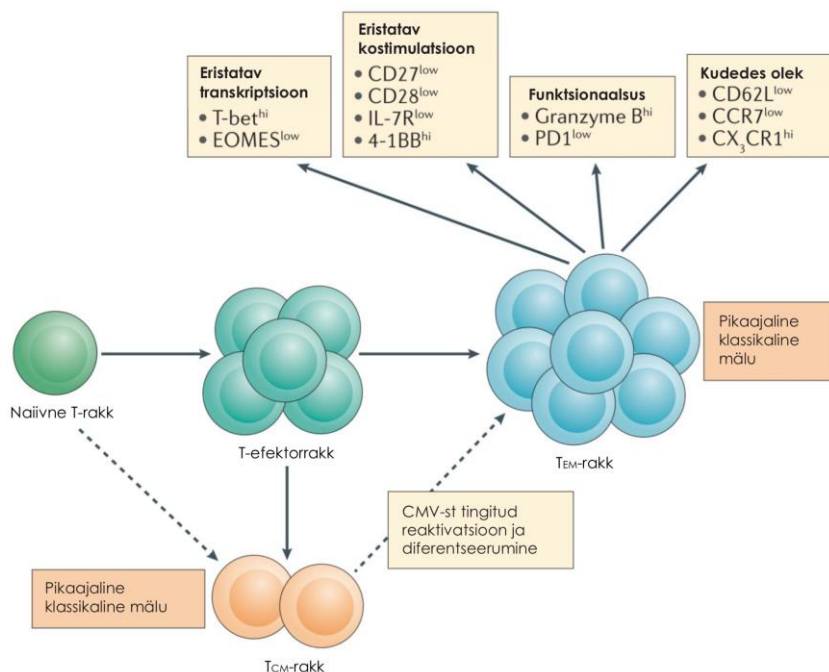
Immuunsüsteem on väga oluline kroonilisi infektsioone põhjustavate viiruste kontrolli all hoidmiseks. Eriti oluline on see herpesviiruste korral, sest neil on arenenud mehhanismid, mis väldivad seda, et immuunsüsteem neid organismist eemaldaks. Erinevalt paljudest teistest kroonilist nakkust tekitavatest viirustest, ei replitseeru herpesviirused pidevalt. Nakkus kulgeb latentelt ja immuunsüsteemile märkamatu ning seetõttu on herpesviirusvastaste ravimeetodite väljatöötamine oluliselt keerulisem. (Virgin *et al.*, 2009) Primaarne CMV-infektsioon kutsub esile tugeva immuunreaktsiooni: ulatusliku NK-rakkude vastuse ja suure hulga viirusvastaste antikehade tootmise (Wills *et al.*, 2015). CMV indutseerib rakku sisenedes esmalt kaasasündinud immuunvastuse, mis väljendub 1. tüüpi interferoonide ja põletikuliste tsütokiinide tootmises (Jackson *et al.*, 2011). NK-rakkude aktivatsioon on väga oluline viirusnakkuste-vastases kaitses (Charpak-Amikam *et al.*, 2017).

1.5.1. Muutused T-lümfotsüütides

CMV-vastane CD8⁺ T-rakkude immuunvastus on ebatavaliselt ulatuslik ja see tekitab aja jooksul üha suurema antigeenispetsiifiliste CD8⁺ T_{EM}-rakkude kuhjumise. CMV-infektsiooni korral on inimesel keskmiselt ~10% CD4⁺ ja CD8⁺ T_M-rakkudest CMV-spetsiifilised, kuid üldiselt on selle mõju CD8⁺ T-rakkude populatsioonidele märgatavalt suurem (Sylwester *et al.*, 2005). Lisaks on täheldatud oluliselt madalama funktsionaalsusega CMV-spetsiifiliste T-rakkude kuhjumist vanade inimeste organismides (Quyang *et al.*, 2003). Üks võimalik viis viirusspetsiifiliste T-rakkude akumulierumise selgitamiseks on immuunsüsteemi võimetus kontrollida latentset CMV-infektsiooni, mille on tinginud langus T-rakkude funktsionaalsuses. Selle tulemusel on viiruslikel antigeenidel võimalik stimuleerida ebaefektiivset CMV-spetsiifilist T-rakkude populatsiooni pikemat aega. (Nikolich-Žugich, 2017)

Vanusest sõltumatult on CMV⁺ inimestel CMV⁻ inimestega võrreldes vähem T_N-rakke, kuid rohkem CD45RA⁺ T_{EF}-rakke. Väiksem CD28⁺ CD45RA⁻, CD25⁺ CD28⁺ CD45RA⁻ ja naiivsete T-rakkude populatsioon CMV-infektsiooniga vanadel inimestel võib olla põhjus, miks neil on normaalsest madalam IL-2 ja IL-4 produktsioon. IL-2 algatab T-rakkude aktivatsioonijärgse proliferatsiooni ning IL-4 toetab B-rakkude efektiivset immuunvastust (Abbas *et al.*, 2017). Nendele muutustele lisaks akumulereerub CMV-infektsiooni tulemusel suur hulk CMV-spetsiifilisi CD8⁺ T-rakke, mis toodavad tsütokiini IFN- γ . Nende kuhjumine tõstab keha üldist IFN- γ taset ja võib selgitada CMV-infektsiooniga kaasnevat suuremat IFN- γ produktsiooni, mida on seostatud näiteks ateroskleroosi arenguga. (Almanzar *et al.* 2005) Erinevalt CMV-negatiivsetest inimestest, on viirusnakkusega inimestel lisaks suuremale CD8⁺ T_{EM} populatsioonile (joonis 5) rohkem CD4⁺ T_{EM} rakke (Wertheimer *et al.*, 2014). Lõpliku konsensuseni, kas ja kuidas CMV mõjutab T_N-rakkude populatsiooni, pole jõutud, sest mõned kohortuuringuid näitavad, et T_N-rakkude arvu vähenemine vanusega on CMV-seropositiivsusest sõltumatu (Wertheimer *et al.*, 2014). Ühtlasi on üks hilisem uurimus näidanud, et CD8⁺ T-rakkude repertuaar vananedes ei vähene ning pakutud teooria kohaselt on CMV-infektsiooniga vanade inimeste nõrgem immuunvastus tingitud peamiselt rakkude funktsionaalsuse mitte repertuaari mitmekesisuse langusest (Lindau *et al.*, 2019).

CMV-vastast immuunvastust iseloomustab konkreetne fenotüüp CMV-spetsiifilistel T-rakkudel: efektormolekulide, peamiselt perforiini ja gransüüm B, kõrgem ekspressioon; CD27 ja CD28 koretseptorite allareguleerimine ning KLRG1 ja CD57 ülesreguleerimine (Appay *et al.*, 2002). CD8⁺ CD57⁺ T-rakkude akumulereerumine, mis on tugevalt seotud CMV-infektsiooniga, võib olla üks põletikulise seisundi põhjustajaid vanadel inimestel, sest need rakud toodavad suures koguses põletikulisi ühendeid ja on tugevate efektorfunktsioonidega (Pinti *et al.*, 2016). Näiteks CMV-spetsiifilistel CD57⁺ T_{EMRA} rakkudel on oluliselt pikemad telomeerid, parem proliferatsioonivõime ja kõrgem IFN- γ produktsioon, kui CD57⁻ T_{EMRA} rakkudel (Verma *et al.*, 2017).



Joonis 5. Mitteklassikiline T-rakkude mälu ja CMV-infektsioon. CD8⁺ T-mälurakkude populatsiooni arenemine algab esmalt CMV-spetsiifiliste T-rakkude proliferatsiooniga, mille käigus omandavad rakud efektorfunktsioonid. Sellele järgneb lühiealiste T_{EF}-rakkude populatsiooni vähenemine ning pannakse alus pikaajalisele T_{CM}-rakkude populatsioonile. CMV-infektsiooniga kaasneb T-mälurakkude ulatuslikum kaasamine T_{EM}-rakkude populatsiooni, kus olevad rakud säilitavad oma efektorfunktsioonid. T_{EM}-rakkudele on iseloomulikud mitmed transkriptsioonilised, funktsionaalsed muutused ning teistsugune pinnamolekulide ekspressioon. (Klenerman, Oxenius, 2016 (kohandatud))

1.5.2. Seos vananemisega seotud haigustega

Kuigi CMV-spetsiifiliste mälurakkude populatsiooni suurenemine suudab ära hoida otseselt CMV-st tingitud haigused, põhjustab oletatavasti väiksem repertuaar vananedes viiruse sagedasemat reaktivatsiooni, mis soodustab kroonilise põletikulise seisundi väljakujunemist (Nikolich-Zugich, 2017). Immuunrakkude vahendatud kroonilist põletikku organismis on seostatud mitmete vananemisega seotud haiguste (näiteks Alzheimeri) tekkimisega (Blasko *et al.*, 1999). Kuna CMV-spetsiifilised T_{EM}-rakud hakkavad välja vahetama T-rakke, mis on spetsiifilised muude antigeenide suhtes, nõrgestab CMV-infektsioon keha immuunvastust teiste haigustekitajate, näiteks EBV, vastu (Derhovanessian *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2004).

CMV-infektsioonil arvatakse olevat selge seos mitmete vananemisega seotud haiguste väljakujunemisega. Näiteks on näidatud, et esineb tugev seos sepsise ja CMV reaktivatsiooni vahel ning CMV-infektsiooniga kaasnevat põletikulist seisundit on pakutud välja riskifaktorina, mis ennustab kõrgemat suremust südame- ja veresoonkonnahaigustesse (Marandu *et al.*, 2019; Simanek *et al.*, 2011). Lisaks on CMV seotud kõrgema süstoolse vererõhuga vanadel inimestel (Firth *et al.*, 2016).

Üle 85-aastastel inimestel on näidatud, et CMV-nakkuse korral on teist tüüpi diabeedi diagnoos sagedasem ja glükeeritud hemoglobiini (HbA1c) hulk kõrgem, mis korreleerub otseselt vere glükoositasemega (Chen *et al.* 2012). Selline seos võib olla selgitatav otseselt CMV-st tingitud kõhunäärme rakkude kahjustustega, mis muutuvad oluliseks alles vanemas eas (Smelt *et al.*, 2012).

Kroonilist neerupuudulikkust põdevatel inimestel on kirjeldatud CMV-nakkusega seotud arterite seina jäigenemist, millest võib järeldada, et neil on suurem tõenäosus haigestuda südame- ja veresoonkonnahaigustesse (Wall *et al.*, 2013). Lõppstaadiumis kroonilist neerupuudulikkust (ingl *end stage renal disease*; ESRD) põdevatel inimestel toimub märgatavalt ulatuslikum T-rakkude diferentseerumine, mida võib veelgi kiirendada CMV-infektsioon. Neil on oluliselt rohkem T_{EMRA}-sid ja vähem T_N-rakke (Chiu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019). Täpne mehhanism, mis seoks omavahel CMV-nakkuse ja ESRD, ei ole teada, kuid välja on pakutud, et varajasem T-rakkude arenemine ja vananemine, mis kaasneb ESRD-ga, tingib sagedasema CMV reaktivatsiooni. See kiirendab T-rakkude diferentseerumist veelgi, põhjustades vanade inimeste enneaegset surma ja suuremat vastuvõtlikkust nakkushaigustele. (Yang *et al.*, 2019)

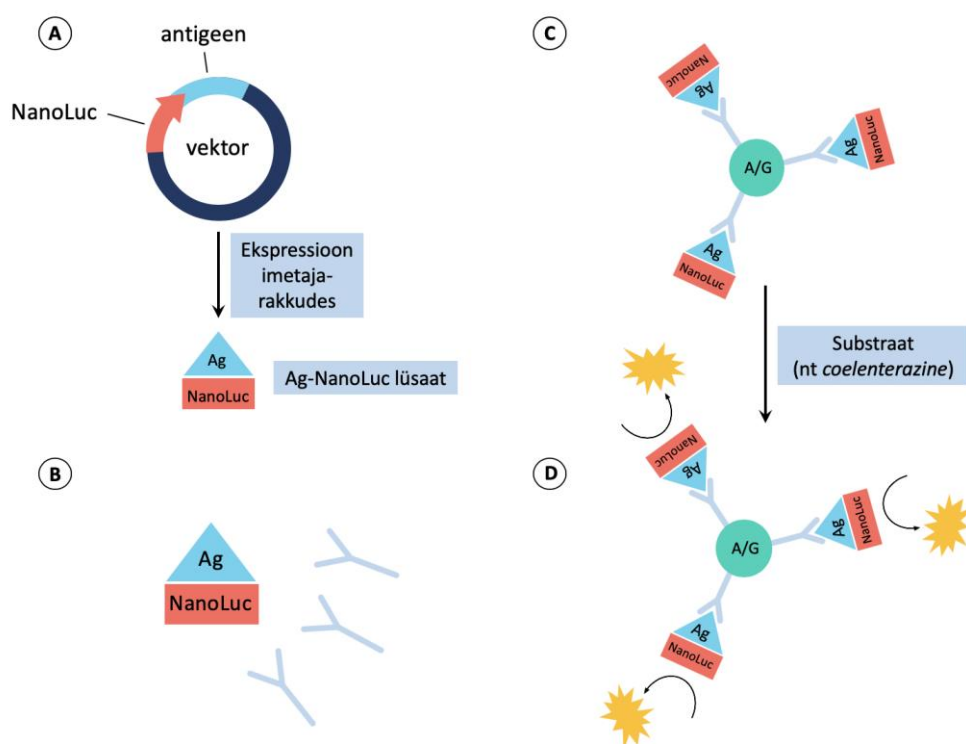
1.6. Lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem

Immunoanalüüs on väga levinud meetod mitmete infektsioonide ja autoimmuunhaiguste tuvastamiseks. Antigeenide määramiseks proovis on kõige laialdasemalt kasutusel näiteks ELISA (ingl *enzyme-linked immunosorbent assay*), immunoblotanalüüs (*Western blot*) ja valgukiibid (Burbelo *et al.* 2010). Nii valgukiipides kui ka ELISA-s kasutatakse enamasti bakterites toodetud valke, mille tulemus on tihtilugu signaali kõrge taustamüra (Burbelo *et al.* 2011). See tekib, sest enamasti ei suudeta kõrvaldada inimese seerumis olevaid antikehasid, mis on spetsiifilised mikroobset päritolu antigeenijääkidele, mida leidub paratamatult peaaegu kõigis antigeenipreparaatides. Kuna bakterites ei toimu valkude post-translatsioonilist modifitseerimist ja need pakitakse vahel valesti kokku, kasutavad mõned immunoanalüüsid pärmi- või putukarakkudes toodetud valke, kuid ka need ei kannu edasi haigustekitaja- ja imetajaspetsiifilisi post-translatsioonilisi modifikatsioone (Burbelo *et al.*, 2005). Nende probleemide lahendamiseks on Burbelo *et al.* välja töötanud alternatiivse meetodina lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteemi (ingl *luciferase immunoprecipitation system*; LIPS), kus kasutatakse antigeenid toodetakse imetajarakkudes (Burbelo *et al.*, 2005).

LIPS-is kasutatakse rekombinantseid luminesseerivaid antigeen-liitvalke, et määrata kvantitatiivselt seerumis olevate antikehade tiitreid (Burbelo *et al.*, 2010). Liitgeenid, mis kodeerivad haigustekitaja antigeeni koos *Renilla*, *Gaussia* või NanoLuc lutsiferaasiga,

ekspresseeritakse imetajarakkudes ja saadud lutsiferaasi-antigeeni lahust kasutatakse LIPS-is antikehaprofiili kvantitatiivseks iseloomustamiseks (Burbelo *et al.*, 2011). LIPS-is kasutatavad lutsiferaasid on head reportervalgud, sest nad on väikesed (alla 30 kDa) ja neil on väga ulatuslik väärtuste määramispiirkond (10^0 - 10^7 LU (*light unit*)) (Burbelo *et al.*, 2010).

LIPS-i läbi viimisel segatakse lutsiferaas-antigeeni liitvalgud inimese seerumi ja A/G-valgukeradega. A/G-valk on rekombinantne valk, kus on liidetud nii proteiin A kui ka proteiin G IgG-d siduvad domeenid. Seejärel määratakse antigeenspetsiifiliste antikehade hulk, lisades lutsiferaasi substraati (näiteks *coelenterazine*'i) ja luminesstents mõõdetakse luminomeetriga (joonis 6) (Burbelo *et al.*, 2009a). Lumineestseeruva valguse intensiivsus on proportsionaalne lahuses oleva antikeha-antigeen kompleksi kogusega, mis on kinnitunud A/G-valgukeradele (Burbelo *et al.*, 2005).



Joonis 6. LIPS-i meetodika ülevaade. (A) Määratava antigeeni (Ag) ja NanoLuc DNA-järjestused liidetakse, rekombinantsed plasmiidid transfecteeritakse imetajarakkudes (antud töös HEK293) ning saadakse antigeenilüsaat. (B) Ag-NanoLuc komplekse inkubeeritakse koos inimese seerumiga ning (C) lisatakse A/G-valgukerad, mis seovad endaga Ag-NanoLuc-antikeha kompleksid. (D) Lutsiferaasi substraadi lisamisega on võimalik kvantitatiivselt mõõta NanoLuc-i luminesstentsi.

Enamik antigeenseid sihtmärke, mida LIPS-is kasutatakse, annavad kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega tulemusi ning selle abil saab kvantitatiivselt hinnata immuunreaktsiooni tugevust. Mida suurem on seonduvate antikehade kontsentratsioon seerumis, seda suurem on LIPS-i luminesstentsväärtus. (Burbelo *et al.*, 2011). Tänu sellele sobib LIPS hästi näiteks

autoantikehade leidmiseks, mille olemasolu tuvastamine on oluline autoimmuunhaiguste diagnoosimisel. Lisaks on immunoanalüüsil oluline roll erinevate nakkushaigustega seotud antikehade mõõtmisel. LIPS-i on tänu oma täpsusele ja tundlikkusele kasutatud näiteks EBV, HIV, HTLV-1, HCV, HHV-8, MERS-CoV, HSV-2 ja VZV-ga seotud antikehade määramiseks ja diagnoosimise tõhustamiseks (Burbelo *et al.*, 2015; Zubair *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2014). Siinse töö kontekstis on ilmselt olulisim Burbelo *et al.* töö, kus kasutati LIPS-i CMV-vastaste antikehade määramiseks ja näidati, et LIPS on selleks sama hea või paremgi kui standardne ELISA (Burbelo *et al.*, 2009b).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö laiem eesmärk oli uurida, kas ja kuidas on eakates inimestes kroonilised põletikulised haigused seotud CMV-vastaste antikehadega ning mil viisil mõjutavad vanus ja sugu nende antikehade taset.

Täpsemad eesmärgid olid:

1. uurida, kas LIPS sobib CMV-infektsiooni kvantitatiivseks iseloomustamiseks ja CMV-seropositiivsuse kvalitatiivseks määramiseks;
2. uurida, mis regiooniga seonduvad antikehad CMV pp150 peptiidil kõige spetsiifilisemalt ning missugune töös kasutatavatest CMV peptiididest iseloomustab CMV-seropositiivsust kõige paremini;
3. analüüsida millised soolised erinevused esinevad CMV-spetsiifiliste antikehateitrite vahel ning kas need on seotud vanuse või teiste haiguslike seisunditega;
4. analüüsida, kas ja kuidas muutuvad CMV-vastased antikehateitrid vanusega;
5. analüüsida, kas kõrgemad CMV-vastased antikehateitrid eakatel inimestel on seotud krooniliste põletikuliste haigustega.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Valimi iseloomustus

Töös on kasutatud 93 eaka (vanus ≥ 65 aastat) inimese proovi SA TÜ Kliinikumi Nahakliinikust (IGN), 224 eaka haige inimese proovi SA TÜ Kliinikumi Sisekliinikust (IGA) ja 186 noorema inimese juhupopulatsiooni proove Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramust (CTG).

Sisekliinikust pärit haigete inimeste kliinilist ja diagnostilist pilti on hinnatud vastavalt rahvusvahelise haiguste klassifikatsiooni 10. versioonile. Kuigi Nahakliinikust saadud proovidele vastavate inimeste haiguslood ei ole täpselt teada, käsitletakse seda tervete eakate inimeste kohordina, tuginedes eeldusele, et need inimesed pole Nahakliinikusse suunatud siinses töös uuritavate haiguste olemasolu tõttu ning on seal seoses kergemate protseduuridega. Eesti Geenivaramust saadud proovid on saadud juhuvaliku alusel tagasi kutsutud doonorite seast, kes valiti kordusuuringusse Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonorite pärilikkuse ja vere biokeemiliste näitajate uuringu jaoks.

Uuringus osalevate isikute kohta on saadud nõusolek Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komiteelt, vastavad load on 206/T-4, August 25, 2011, (CTG), 272/T-12, August 21, 2017 (IGN) ja 275/M-17, November 20, 2017 (IGA). Kõik uuringus osalenud isikud olid vanemad kui 18 aastat ja iga uuritava käest võeti kirjalik nõusolek uuringus osalemiseks. Proovid on pseudonümiseeritud. Lühike kirjeldus uuringurühmadest, nende soost ja vanusest on tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud kohortide koosseisu ja struktuuri iseloomustus

Kohort	Arv	Vanus (aasta; $\bar{x} \pm \sigma$)	Kirjeldus
IGA	224 (67 meest, 157 naist)	76,89 $\pm$ 6,97 (min 65, max 96)	Koosneb eakatest ja haigetest inimestest, kellel on enamasti diagnoositud mitu erinevat haiguslikku seisundit.
IGN	93 (38 meest, 55 naist)	75,74 $\pm$ 7,07 (min 65, max 95)	Koosneb eakatest inimestest, kellel diagnoositud haigused ei ole teada, kuid keda käsitletakse tervetena.
CTG	186 (98 meest, 88 naist)	36,58 $\pm$ 9,46 (min 18, max 54)	Koosneb noorematest ja tervetest inimestest.

$\bar{x}$ - keskmine

σ - standardhälve

2.2.2. Kasutatud praimerid

CMV fragmentide kloonimiseks pNanoLuc1 vektorisse (konstrueeritud Molekulaarpatoloogia laboris, TÜ) kasutati nelja erinevat praimerit: N1P150d2F, N1P150d2.1R, N1P150d2.2F ja N1P150d2R, kus F – *forward* ja R – *reverse*.

Tabel 2. Kloonimisel kasutatud CMV p150 d2 praimerid

Praimer	Järjestus (5'-3')
N1P150d2F	TTTGGATCCTAACGGAGGATGATGTCGTGTCCCC
N1P150d2R	TTTGCGGCCGCCTATTCCTCCGTGTTCTTAATCTTCTCGATCTTTTG
N1P150d2.1RR	TTTGCGGCCGCCTACGTGGTCGAGGCGGCCCGGCT
N1P150d2.2F	TTTGGATCCTACCGACGTATCCCGCGGTAACCACCGTTTACC

2.2.3. Polümeraasi ahelreaktsioon ja restriksioonreaktsioon

PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon on meetod DNA fragmentide kloonimiseks ja amplifitseerimiseks. Antikehade tugevaima seondumiskoha määramiseks lõigati CMV n1 pp150-d2 fragment kaheks lühemaks järjestuseks. Töös kasutatud CMV pp150-d2 järjestus on omane isolaadile *Human Hepresvirus 5 isolate HAN*. Uued fragmendid olid n1 CMV pp150-

d2.1 (1.–80. aluspaar) ja n1 CMV pp150 d2.2 (81.–191. aluspaar). Kuna algne CMV pp150-d2 oli kloneeritud pNanoLuc1 vektorisse, kasutati sama plasmidi, et saada uued PCR-fragmendid, mis omakorda kloneeriti antud vektorisse. Valmistati eraldi PCR-i segud d2.1 ja d2.2 jaoks ning nende tegemiseks kasutati 32 µl MQ, 10 µl 5x Thermo Scientific™ High-Fidelity puhvrit, 1,0 µl dNTP (10 mM), väga väikest kogust kloneeritavast matriitsplasmidist, 1,5 µl DMSO-t ja 0,5 µl Thermo Scientific™ High-Fidelity DNA polümeraasi. Fragmendi d2.1 segule lisati 2,5 µl nii 10 µM praimerit N1P150d2F kui ka 10 µM praimerit N1P150d2.1R. Fragmendi d2.2 segule lisati 2,5 µl 10 µM praimerit N1P150d2.2F ning 10 µM praimerit N1P150d2R.

Produkti olemasolu kontrollimiseks tehti kontrollforees, kasutades 5 µl PCR-i segu ja 3 µl 100 bp DNA markerit (100 bp DNA ladder, Solis Biodyne). 100 ml geeli kohta lisati 5 µl etiidiumbromiidi (10 mg/ml). Geelelektroforees viidi läbi 1% agarosgeelil, mille valmistamisel kasutati 1x TAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8). PCR-i segu puhastati kolonniga, kasutades Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit-i vastavalt tootja välja pakutud protokollile.

Kloneerimiseks vajaliku DNA lõikamine restriksiooniensüümide ehk restriктаaside abil on järjestusspetsiifiline ensüümreaktsioon. DNA lõikamiseks kasutati 16 µl PCR-fragmentide proovi, millele lisati 2 µl 10x *FastDigest* restriksioonipuhvrit (Thermo Scientific) ja 1 U kumbagi sobivat restriктаasi (NotI ja BamHI). Vektori lõikamiseks kasutati 1 µg vektorit, 3 µl sama restriksioonipuhvrit, 1 U kumbagi restriктаasi, 1 µl CIAP-i (*Calf intestinal alkaline phosphatase*) ja 25 µl MQ-d (Milli-Q). Restriктаaside reaktsioonid viidi läbi 37 °C juures 30 minuti jooksul. CIAP-i inaktiveerimiseks pandi vektorisegu 15 minutiks 65 °C juurde.

2.2.4. Ligatsioon ja transformatsioon

Kõik proovid kanti 1% agarosgeelile koos 3 µl 100 bp DNA markeriga. Etiidiumbromiidi lisati 100 ml geeli kohta 10 mg/ml kangusega alglahusest 5 µl. Peale foreesi lõppu lõigati vajalikud DNA fragmendid UV-lambi all geelist välja ja asetati 1,5 ml katustitesse. DNA puhastati geelist välja kolonniga vastavalt tootja välja pakutud protokollile, kasutades Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit-i (Thermo Scientific).

Ligeerimissegud koosnesid 10,5 µl vastavast PCR fragmendist (d2.1 või d2.2), 2 µl vektori eluaadist, 1,5 µl ligeerimispuhvrist ja 1 µl T4 DNA ligaasist (Thermo Fischer Scientific). Ligeerimine viidi läbi toatemperatuuril ja sel lasti kulgeda üks tund. Ligaasi inaktiveerimiseks hoiti segusid 10 minutit 65 °C juures. Ligeerimisegu transformeerimiseks 100 µl kompetentsetesse *Escherichia coli* rakkudesse sulatati nii ligeerimissegud kui ka bakteriproovid jääl. Valmistati kaks eri proovi: bakterid ja pool d2.1 ligeerimissegust ning

bakterid ja pool d2.2 ligeerimissegust. Peale 30 minutit jää peal hoidmist pandi proovid kolmeks minutiks 37 °C juurde ning peale seda tagasi jääle. Proovidele lisati 1 ml LB söödet ja need asetati 45 minutiks 37 °C juures olevasse kappi, proove tsentrifuugiti 6000 rpm 3 minutit ja kanti kahele erinevale tardsöötmele Petri tassile, millele oli lisatud antibiootikumi Km25 (kanamütsiin). Kultuurid jäeti 37 °C juures üleöö inkubeerima ning hommikul pandi tassid 4 °C juurde. Tassidel olevatest kolooniatest minipreparaatide tegemiseks pandi 2 ml bakteriproovi Km25 söötmesse üleöö kasvama 37 °C juurde. Peale seda tsentrifuugiti 2 ml proove 3 minutit 6000 rpm ning supernatant aspireeriti. Proove säilitati töö jätkamiseni –20 °C juures.

2.2.5. Plasmiidse DNA mini- ja midipreparatsioon

Mini- ja midipreparatsiooni kasutatakse DNA eraldamiseks ja plasmiidse DNA puhastamiseks. Minipreparaatide tegemiseks kasutati Thermo Scientific™ GeneJET Plasmid Miniprep Kit-i, järgides tootja poolt välja pakutud protokoll. Proove säilitati –20 °C juures töö jätkamiseni.

Et valida välja parimad proovid, tehti minipreparaatidele restriksioon ja kontrollfoores. Restriksioonisegudes kasutati 1 µl kumbagi restriктаasi (NotI ja BamHI), 2 µl restriksioonipuhvrit, 4 µl minipreparaadi proovi ja 12 µl destilleeritud vett.

Õige foreesipildiga proovid saadeti järjestuse kontrollimiseks sekveneerimisele Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse. Selle jaoks kanti 5 µl igast sobivast proovist 200 µl katsutisse, iga proovi kohta kulus 1 µl 10 µM sekveneerimispraimerit NSF. Saadud sekveneerimistulemuste põhjal valiti välja proovid, mis vastasid soovitud korrektsele järjestusele. Valitud kolooniatest pandi bakterid kasvama 100 ml Km25 söötmesse 19–20 tunniks. Proove tsentrifuugiti RC 5B tsentrifuugiga 15 minutit 4500 rpm.

Midipreparatsioon viidi läbi kasutades NucleoBond® Xtra Midi EF kit-i (Macherey-Nagel) tootja välja pakutud protokoll alusel. Peale midipreparatsiooni määrati plasmiidi kogus iga proovis, kasutades UV-spektromeetrit.

2.2.6. Rakukultuur

HEK293 (inimese embrüonaalsed neerurakud) rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) söötmes 37 °C juures. Segati kokku sulatatud HEK293 rakud ja 10 ml DMEM-i ning segu tsentrifuugiti 10 minutit 300×g 21 °C juures, supernatant aspireeriti. Rakkudele lisati 1 ml DMEM-i ning need pandi üleöö kasvama 9 ml söötmesse koekultuuri plaadile. Rakud loeti ja leitud kontsentratsiooni põhjal ($3,5 \times 10^6$ rakku/ml) leiti ligikaudne rakuproovi ruumala (71 µl), milles oli $2,5 \times 10^5$ rakku. Seejärel lisati plaadile 1 ml PBS, see aspireeriti ning rakkude

eemaldamiseks plaadilt lisati 1 ml trüpsiini ja 5 ml DMEM-i. Kogu proov plaadilt kanti 15 ml katsutisse ning seda tsentrifuugiti 10 minutit $300\times g$ 21 °C juures. Supernatant aspireeriti ja rakke suspendeeriti 2 ml DMEM söötmes. Rakud külvati 6 kaevukesega plaadile. Iga plasmidi kohta pandi kaevukesse 71 µl rakuproovi ($2,5 \times 10^5$ rakku) 3 ml söödet ning rakud jäeti kasvama kaheks päevaks.

2.2.7. Transfektsioon

Transfektsiooni käigus viiakse geneetiline materjal eukarüootsetesse rakkudesse mitteviraalsel teel. Transfektsiooniks kasutati 4 µl DNA ja 8 µl lipofektamiini 2000 (Invitrogen) 250 µl optiMEM söötmes ning transfektsioonisegu lisati rakkudele. Lipofektamiin on lisanditega liposoomidel põhinev plasmidse DNA transfektsiooni tõhustav reagent. Sellise transfektsiooni käigus viiakse plasmidne DNA rakku liposoomide (vesilahuses lipiidsetest alaühikutest iseeneslikult moodustuvad vesikulid) sisemuses. HEK293 rakud jäeti kasvama 5% CO₂ 37 °C juurde neljaks päevaks. Igas kaevukeses olev sööde kanti ümber eraldi 15 ml katsutisse, neid tsentrifuugiti 5 minutit $800\times g$ ning need kanti ümber uude katsutisse.

Rakkude lüüsimiseks ja lüüsitud rakuproovide saamiseks pesti kaevukesi kõigepealt 1 ml PBS-iga ning seejärel lisati 500 µl 5-kordset lüüsi puhvri lahjendust. Plaati inkubeeriti 15 minutit loksutil ning siis kanti proovid uutesse katsutitesse, mida tsentrifuugiti 1 minut maksimumkiirusel. Supernatant kanti omakorda uutesse 1,5 ml katustitesse.

Igas proovis (p150 d2.1 lüüsimata, p150 d2.1 lüüsitud, p150 d2.2 lüüsimata, p150 d2.2 lüüsitud) mõõdeti lutsiferaasensüümi aktiivsust.

2.2.8. ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) põhimõte on ensüümil põhinev immunoanalüüs, et kvalitatiivselt tuvastada ligandi, tihtilugu valgu, olemasolu proovis, kasutades tuvastatava ligandi spetsiifilisi antikehasid. Katses mõõdeti ELISA meetodil patsientide proovidest IgM ja IgG tüüpi antikehade olemasolu CMV peptiidide n1 pp150-d1, n1 pp150-d2, n1 gB1 ja n1 gB2 vastu. Töö tehti tootja välja pakutud protokollil (TestLine) alusel, kasutades eelnevalt CMV antigeeniga kaetud 96 kaevukesega plaati. Kasutati 1 : 101 lahjendusega proove. Eraldi kaevukestesse pipeteeriti vastavalt 100 µl tootja pakutud negatiivset kontrolli, 100 µl positiivset kontrolli, kahte kaevukesse pipeteeriti 100 µl CUT-OFF proovi ja ülejäänud kaevukestesse 100 µl igat vastavat proovi, üks kaevuke jäeti tühjaks. Kaetud plaati inkubeeriti seejärel 37 °C juures 30 min. Lahused aspireeriti plaadilt ja kaevukesi pesti viis korda, kasutades tootja pakutud pesulahust, millega iga pesu jooksul kaevukesed ääreni täideti. Kõikidesse kaevukestesse, v.a tühja kaevukesse, pipeteeriti 100 µl konjugaati ja kaetud plaati inkubeeriti 37 °C juures 30

min. Konjugaat aspireeriti ja plaati pesti taas eelnevalt kirjeldatud viisil. Kõigisse kaevukestesse pipeteeriti 100 µl TMB-d (ingl 3,3', 5,5'-*tetramethylbenzidine*) ja kaetud plaati inkubeeriti pimedas 37 °C juures 30 min. Reaktsioon peatati, lisades kaevukestesse 100 µl stopplahust. Värv intensiivsus mõõdeti fotomeetris proovita tühja kaevukese suhtes lainepikkusel 450 nm.

2.2.9. LIPS

LIPS (*Luciferase Immunoprecipitation Systems*) on seroloogiline immunoanalüüsi meetod, kus kasutatakse imetajarakkudes toodetud rekombinantseid lutsiferaasiga liidetud kimäärseid antigeene, et efektiivselt ekspresseerida sihtmärk-antigeene ning kvantitatiivselt määrata vastavaid antikeha vastuseid. Katsetes kasutati rekombinantse lutsiferaasina süvamere krevetist (*Oplophorus gracilirostris*) pärit NanoLuc (Promega) geeni. Seerumite ja antigeeni lahjenduste puhul ning plaadi pesemisel kasutati puhver A-d (10 ml 50 mM Tris puhvrit pH 7.5, 4 ml 5 M NaCl, 1 ml 1 M MgCl₂, 2 ml 100% Triton X-100, 183 ml destilleeritud vett MQ). Ühe 96 kaevukesega HTS MultiScreen filterplaadi (Millipore) kohta valmistati 2x1200 µl Proteiin G agaroskerade suspensiooni (4% suspension, Exaplha Biologicals). 1200 µl suspensiooni jaoks võeti alglahusest 100 µl kerade suspensiooni ja pesti 300 µl PBS-iga tsentrifuugides 5 min 300×g. Supernatant aspireeriti ja kerad suspendeeriti 1200 µl puhver A-s. Igasse kaevukesse pipeteeriti 25 µl seerumi lahjendust (1 : 10 või 1 : 100) ja 25 µl Proteiin G kerade suspensiooni ning siis inkubeeriti loksutades üks tund. Igasse kaevukesse lisati 50 µl 2 · 10⁶ LU antigeeni ja inkubeeriti loksutades üks tund. Plaat pesti vaakumsüsteemi kasutades neli korda puhvriga ja neli korda PBS-iga. Ühe kaevukese kohta kulus üheks pesuks kumbagi 150 µl. Enne mõõtmist pipeteeriti igasse kaevukesse 20 µl 1:1000 NanoBret™ NanoGlo® (Promega) substraati. Lumineestsentsi intensiivsust mõõdeti masinaga Victor X5 (PerkinElmer Life Sciences) viie sekundi jooksul.

2.2.10. T-rakkude stimulatsioonist ja sortimine

T-rakkude stimulatsioonist seisneb T-rakkude *in vitro* aktiveerimises, kasutades antigeene või TCR-vastaseid antikehi, mille tulemuseks on mõõdetav T-rakkude proliferatsioon. Töö jaoks kasutati X-VIVO™ 15 söödet (Lonza Walkersville, Inc.), millele oli lisatud 1 : 10 L-glutamiini.

Katsutis olevad PBMC-d (perifeerse vere mononukleaarsed rakud) sulatati kiiresti vesivannis ning kanti seejärel üle 15 ml katsutitesse. Katsuti puhastati 1 ml söötmega ning see kanti tilkhaaval 15 ml katsutisse. Seejärel lisati tilkhaaval veel söödet kuni rakususpensiooni oli ligikaudu 10 ml. Rakud loendati, kasutades LUNA-FL™ *Dual Fluorescence* rakuloendurit

(Biologos), ja tsentrifuugiti 10 min toatemperatuuril 400×g. Supernatant aspireeriti ja rakkudele lisati X-VIVO™ 15 söödet nii, et 100 µl kohta oli ~1 · 10⁶ rakku. Sööde oli varem seisnud lahti keeratud korgiga 30 minutit 37 °C 5% CO₂ inkubaatoris. Rakususpensioonist 100 µl pipeteeriti 5 ml polüpropeenkatsutisse – seda kasutati negatiivse kontrollina. Ülejäänud proov kanti 24 kaevukesega plaadi ühte kaevukesse. Segati kokku kostimulantide segu (100 µg/ml): 40 µl X-VIVO™ 15+L-glutamiin, 5 µl anti-CD28 (1mg/ml, BD Biosciences) ja 5 µl anti-CD49d (1mg/ml, BD Biosciences). Negatiivsesse kontrolli lisati 100 µl rakususpensiooni kohta 3 µl kostimulantide segu ja 1 µl CD40 vastast funktsionaalset antikeha (Miltenyi Biotec), mis takistab CD40 seondumise oma ligandiga CD154 ning viimase allareguleerimise rakupinnalt. Kaevukeses olevatele rakkudele, mida stimuleeriti CMV pp65 peptiidiga, lisati 100 µl kohta 3 µl kostimulantide segu, 2 µl Pep Tivator CMV pp65 segu (60 nmol/peptiid; Miltenyi Biotec) ja 1 µl CD40-vastast antikeha. Mõlemaid stimulatsioone hoiti 16–24 h 37 °C juures 5% CO₂ inkubaatoris.

Peale inkubeerimist proove segati. Negatiivsele proovile kanti peale 1 ml külma 2mM EDTA-PBS-i ning inkubeeriti 10 minutit 37 °C juures. CMV pp65 stimulatsioonile lisati 1 ml külma 2 mM EDTA-PBS-i, suspendeeriti ning kanti polüpropüleenkatsutisse, seejärel sama protsessi korrati, nii et lõpuks oli proovile lisatud kokku 2 ml 2mM EDTA-PBS-i. Ka stimulatsiooni inkubeeriti 10 minutit 37 °C juures. Seejärel mõlemaid proove segati 30 sekundit, negatiivne kontroll kanti 1,5 ml katsutisse ning stimulatsioone tsentrifuugiti 400×g 5 minutit 4 °C juures.

Proove hoiti jääl, supernatant aspireeriti ja mõlemale stimulatsioonile lisati 25 µl FcR blokaatori lahjendust (iga proovi kohta arvestati 21 µl RB puhvril (100 ml 0,5% BSA + 4 ml 2mM EDTA + 900 ml PBS) ja 5 µl FcR-lahust (Miltenyi Biotec) ning suspendeeriti pipetiga. 5 minuti pärast lisati mõlemale stimulatsioonile 25 µl antikehade segu vastavalt tabelis 3 esitatud kogustele.

Tabel 3. Antikehade segu

Antikeha	Konjugaat	Kogus ühe proovi kohta (µl)	Firma
CD154	BV421	2	BD Biosciences
CD137	PE	2	BD Biosciences
CD3 (1:10)	PerCP-Cy5.5	3	BD Biosciences
CD4 (1:10)	AF700	5	BD Biosciences
CD8	BV605	0,75	BD Biosciences
RB		12	

Antikehade segu inkubeeriti 30 minutit 4 °C juures. Segule lisati 1 ml RB söödet, tsentrifuugiti 400×g 5 minutit 4 °C juures, supernatant aspireeriti ja sade resuspendeeriti 200 µl RB söötmes. Enne FACS-i (fluorestsents-aktiveeritud rakkude sortimine) alustamist lisati segule 3 µl 7-AAD (Miltenyi Biotec).

2.2.11. Andmeanalüüs

LIPS-i ja ELISA tulemuste analüüsiks ja visualiseerimiseks kasutati programmeerimiskeelt R ja integreeritud arenduskeskkonda RStudio. Algsete andmete koondamine toimus MS Excel 2019 abiga. Plasmidiiskeemide koostamiseks kasutati SnapGene'i.

Et hinnata LIPS-i võimekust eristada CMV-seropositiivseid ja -seronegatiivseid proove, kasutati töökarakteristikute kõverat (ingl *receiver operating characteristic*; ROC) ja ROC-analüüsi graafiku graafikualust pindala (ingl *area under curve*; AUC). ROC-graafik iseloomustab (diagnostilise) mudeli võimekust eristada erinevaid klasse, antud juhul CMV seropositiivseid ja -negatiivseid proove. Selle LIPS-analüüsi puhul näitab tundlikkus, kui suure osa CMV-seropositiivsetest suudab test õigesti kategoriseerida, ja spetsiifilisus seda, kui suure osa CMV-seronegatiivsetest suudab test õigesti kategoriseerida. Seejuures, mida suurem on AUC, seda parema diferentseerimisvõimega on mudel.

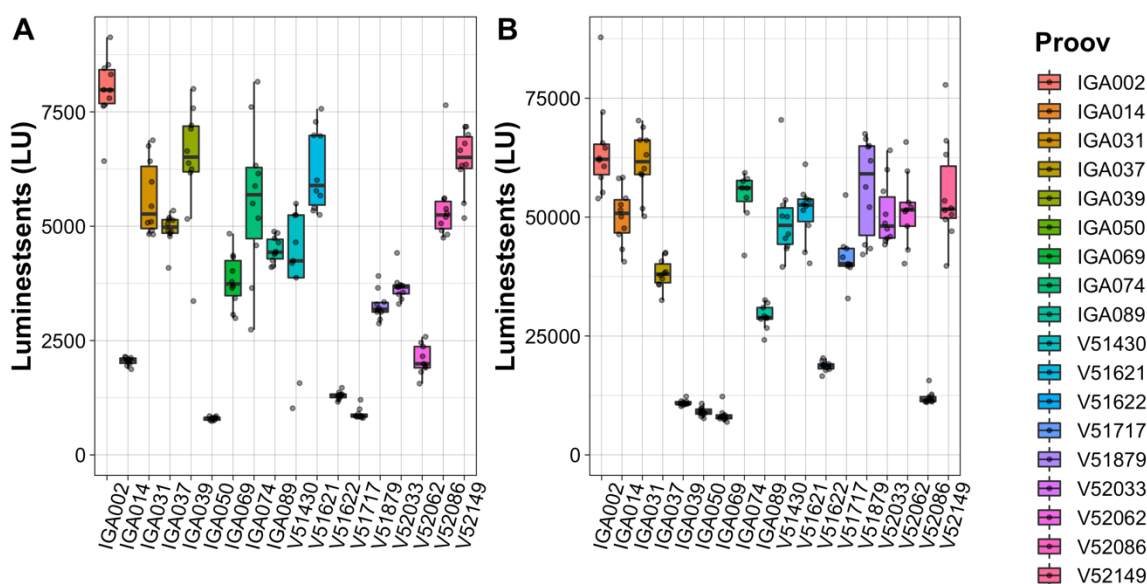
Et määrata, kas sugu või vanus mõjutavad CMV seropositiivsust ning kuidas on haiguse olemasolu seotud CMV-spetsiifiliste antikehateitritega, kasutati regressioonianalüüsi. Töös ei uuritud põhjuslikke seoseid, vaid erinevate näitajate omavahelist korrelatsiooni.

3. TULEMUSED

3.1. LIPS võimaldab hinnata CMV-spetsiifiliste antikehade taset seerumis

Et kindlaks teha, kas LIPS on sobilik CMV määramiseks, tuli uurida, kas patsientide seerumis olevad antikehad seonduvad korrektselt kloneeritud NanoLuc-antigeenidega ning kas proovidevaheline luminesentsväärtuste varieeruvus on piisavalt suur, et eristada eri tugevusega proove, seejuures piisavalt väikese paralleelidevahelise varieeruvusega sama proovi korduvmõõtmisel.

LIPS-is kasutatavate antigeenilüsaatide saamiseks kasutasime imetaja lutsiferaasi ekspressioonivektorit (antud töös pNanoLuc1) ning saadud antigeenid olid seotud NanoLuc lutsiferaasiga, mis on bioluminestsentsi indutseeriv ensüüm. Neid plasmiide ekspresseerisime imetaja HEK293 rakuliinis. Et uurida, kas proovide korduval mõõtmisel LIPS-iga saame sarnased luminesentsväärtused, mis on oluline eeldus kvantitatiivseks analüüsiks, valisime kokku 18 erineva CMV-spetsiifiliste antikehahätiitritega proovi IGA ja CTG kohortidest ning mõõtsime LIPS-iga proovide pp150-d1 (joonis 7A) ja pp150-d2 (joonis 7B) luminesentsi 9-10 paralleelis. Seejärel hindasime variatsioonikordajat paralleelide lõikes. Variatsioonikordaja on defineeritud kui andmestiku standardhälbe ja keskmise väärtuse omavaheline suhe.



Joonis 7. Valitud proovide (A) pp150-d1 (B) pp150-d2 spetsiifilised antikehateitrid korduval mõõtmisel paralleelides. Graafikutel A ja B on kujutatud 18 proovi pp150-d1 ja pp150-d2 luminescentsväärtuste keskmist suurust ja varieeruvust kordusmõõtmisel 9–10 paralleelis.

Keskmine proovide pp150-d1 paralleelide variatsioonikordaja oli 13,70% ja pp150-d2 jaoks 12,50%, mis iseloomustavad LIPS-i väga head korratavust. Paralleelide omavaheline varieeruvus kasvas kõrgemate antikehateitritega proovide korral, kuid see erinevus ei olnud märgatav. Lisaks on pp150-d2 variatsioonikordaja kõrgematest väärtustest hoolimata madalam kui pp150-d1 oma, mis näitab, et LIPS on kogu väärtuste määramispiirkonna ulatuses suhteliselt ühtlase väärtuste variatsiooniga. Nii pp150-d1 kui ka pp150-d2 puhul on näha, et nõrkade ja tugevate proovide väärtuste vahel esineb mitmekordne erinevus – selle põhjal võib öelda, et LIPS-iga on võimalik edukalt eristada erineva antikeha hulga proove.

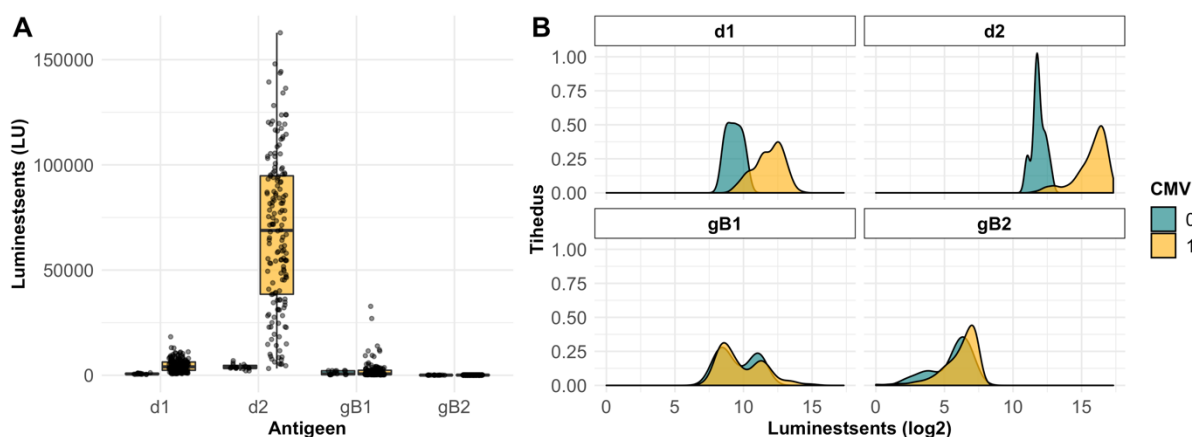
3.2. pp150-d2 on sobiv antigeen CMV-seropositiivsuse määramiseks

LIPS-i kasutamiseks CMV kvantitatiivse ja kvalitatiivse analüüsimetodina oli vaja teha kindlaks, missuguse antigeeni või antigeenide kombinatsiooni luminescentsväärtused iseloomustavad kõige paremini CMV-seropositiivsust. Selle uurimiseks võrdlesime LIPS-i tulemusi varasemalt CMV antikehade määramiseks välja töötatud ELISA-meetodiga ning analüüsisime erinevusi ELISA-ga määratud CMV-seropositiivsete ja CMV-seronegatiivsete proovide LIPS-i luminescentsväärtuste vahel.

LIPS-i läbiviimiseks kasutasime seerumeid, mille seronegatiivsus või seropositiivsus oli ELISA abil määratud. Kõiki proove testisime ELISA-ga nii CMV IgG kui ka CMV IgM suhtes. Seropositiivseteks määrasime 165 proovi, mis olid ELISA põhjal CMV IgG positiivsed, ja

nendest 13 olid ka CMV IgM positiivsed. Kokku kasutasime 180 seerumit, millest 15 olid seronegatiivsed.

Kõige parema mudeli CMV määramiseks saab, kasutades fragmenti, mille puhul seropositiivsete ja seronegatiivsete proovide CMV-vastaste antikehade tiitrid kattuvad kõige vähem, sest sellisel juhul on mudel kõige täpsem. Kuna seronegatiivsuse ja -positiivsuse määramine toimub valimis kindla intervalli sees (minimaalsest luminescentsväärtusest maksimaalseni), oli võimalik luminescentsväärtustest luua jaotus väärtuste sageduse alusel.



Joonis 8. (A) Anti-p150-d1 (d1), anti-p150-d2 (d2), anti-gB1 (gB1) ja anti-gB2 (gB2) antikehade määramine LIPS-iga. ELISA teel CMV seropositiivseteks (POS) määratud proovide LIPS-i luminescentsväärtus on kujutatud igale antigeenile vastavas vasakpoolses tulbas ning seronegatiivseteks (NEG) määratletud proovide oma igas parempoolses tulbas. (B) pp150-d1, pp150-d2, gB1 ja gB2 luminescentsväärtuste jaotus tiheduse alusel. Luminescentsväärtused on kujutatud log₂ skaalas.

Jooniselt 8A on näha, et pp150-d2 suhtes mõõdetud luminescentsväärtuste suurusjärgude erinevus CMV-seropositiivsete ja CMV-seronegatiivsete proovide vahel on väga suur, andes väga hea eristusvõime. Ühtlasi oli pp150-d2 väärtustel suurim varieeruvus, mis muudab selle kvantitatiivse analüüsi jaoks sobivaimaks (joonis 8A). Negatiivsete ja positiivsete proovide antikehastiitrite erinevuse kohandatud Wilcoxon'i testi p-väärtused on pp150-d1 ja pp150-d2 jaoks vastavalt $4,04 \times 10^{-9}$ ja $6,24 \times 10^{-9}$, gB1 jaoks 0,51 ja gB2 jaoks 0,16.

Lähtudes varem sõnastatud põhimõttest, sobib mudelis kasutamiseks kõige paremini pp150-d2, sest positiivsete ja negatiivsete väärtuste graafikute ühine pindala, kus positiivseid proove pole võimalik negatiivsetest eristada, on kõige väiksem (joonis 8B).

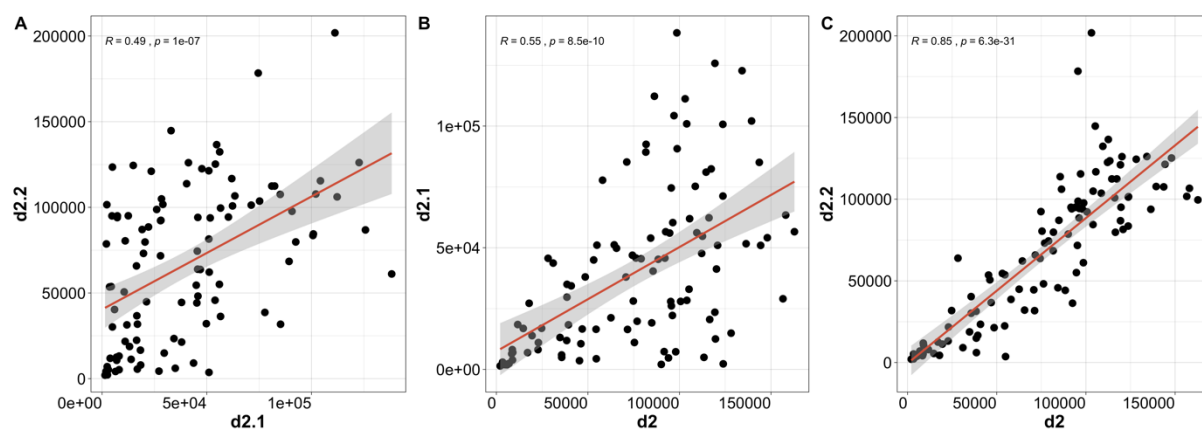
Nende kahe graafiku alusel võib järeldada, et pp150-d2 on CMV-seropositiivsuse määramiseks kõige parem ja kvantitatiivse analüüsi jaoks sobivaim. Ka pp150-d1 fragmendi LIPS-i väärtustest võiks teatud juhtudel CMV-seropositiivsuse määramisel kasu olla, aga

seevastu gB1 ja gB2 luminesentsväärtuste alusel on CMV-seropositiivsete eristamine seronegatiivsetes pea võimatu ning seetõttu on need CMV tuvastamisel kasutatud (joonis 8B).

3.3. CMV-seropositiivsete inimeste antikehad ei ole suunatud kindla pp150-d2 regiooni vastu

Eelneva analüüsi põhjal leidsime, et pp150-d2 on CMV määramiseks kõige sobivam antigeen ning sellele toetudes võib järeldada, et antikehad seonduvad pp150-d2 fragmendiga tugevamini kui pp150-d1 fragmendiga. Tahtsime edasi uurida, kas on võimalik teha kindlaks täpsem antikehade seondumiskoht pp150-d2 peptiidil. Esiteks võimaldab antikehade seondumiskiirguse täpsem määratlemine kasutada edasises töös väiksemat plasmiidset konstrukti, millega oleks lihtsam töötada. Teiseks annaks see lisainfot antikehaga seonduva epitoobi struktuuri ja omaduste kohta. Selle jaoks konstrueerisime uued plasmiidid, jagades pp150-d2 peptiidi kaheks osaks: pp150-d2.1 ja pp150-d2.2 (lisa 2).

Et teha kindlaks, kas antikehad seostuvad tugevamini pp150-d2.1 või pp150-d2.2 osaga, mõõtsime 106 proovi LIPS-i luminesentsväärtused pp150-d2.1 ja pp150-d2.2 antigeenilüsaate kasutades ning võrdlesime tulemusi samade proovide pp150-d2 väärtustega.



Joonis 9. (A) pp150-d2.1 väärtuste korrelatsioon pp150-d2.2 väärtustega, (B) pp150-d2.1 väärtuste korrelatsioon pp150-d2 väärtustega ja (C) pp150-d2.2 väärtuste korrelatsioon pp150-d2 väärtustega.

pp150-d2 seos mõlema peptiidiga on väga tugev, kuid d2.2 korreleerub d2 väärtustega paremini. CMV-vastased antikehad seonduvad sellele fragmendile mingil määral spetsiifilisemalt (joonised 9B ja 9C). Kahe lühema fragmendi omavaheline korrelatsioon on oodatav tulemus, kuid samas näitab see, et antikehade seondumine ei ole piiratud ühe kindla antigeense epitoobiga, vaid toimub üle terve peptiidi (joonis 9A). Kuna analüüs näitas, et CMV

pp150-d2 vastased antikehad ei ole suunatud teatud kindla regiooni vastu ja on pigem jagunenud hajusalt üle kogu pp150-d2 fragmendi, kasutasime edasises töös täispikka pp150-d2 sisaldavat konstrukti. Kuigi võib öelda, et antikehad seonduvad pp150-d2.2 fragmendile spetsiifilisemalt kui pp150-d2.1 fragmendile, on mõlemal juhul siiski tegemist CMV epitoopidega. Suure tõenäosusega ei suuda pp150-d2.2 CMV-seropositiivsust sama hästi hinnata kui pp150-d2 tervikuna, sest joonisel A on näha, et on olemas ka proove, mille korral pp150-d2.1 vastane antikehatiiter on väga kõrge, aga pp150-d2.2 fragmendi oma madal. Seetõttu, kasutades vaid pp150-d2.2 fragmenti, jääksid üksikud varem kirjeldatud proovid CMV-seropositiivseteks määramata.

3.4. LIPS on kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkusega kvalitatiivne test

Edasi soovisime hinnata, kas LIPS on kvalitatiivse testina võrdväärne ELISA-ga. Kvantitatiivsete andmete kasutamiseks seropositiivsuse hindamisel on vaja määrata luminesentsväärtuste piirväärtus (ingl *cutoff*), millest kõrgemad tulemused määratakse CMV-seropositiivseteks ja madalamad CMV-seronegatiivseteks. Selle jaoks kasutasime ROC-analüüsi ja selle graafikualust pindala, AUC-i. ROC-analüüsi arvulised tulemused on kujutatud tabelis 4 ja graafikud asuvad lisa 3.

Tabel 4. ROC-analüüsi arvulised tulemused

Antigeen	Tundlikkus (<i>sensitivity</i>)	Spetsiifilisus (<i>specificity</i>)	Piirväärtus (LU)
pp150-d1	89,60%	100,00%	1199
pp150-d2	96,30%	100,00%	6924

Juhul, kui kasutada vaid pp150-d1, tuleb piirväärtuseks 1199 LU, kus tundlikkus on 89,60%, spetsiifilisus 100,00% ja testi täpsus 0,9162 (lisa 3A). pp150-d2 korral peaks piirväärtuseks määrama 6924 LU, kus tundlikkus on 96,30%, spetsiifilisus 100% ja testi täpsus 0,9665 (lisa 3B). pp150-d1 AUC oli 0,9770 ja p150-d2 AUC oli 0,9910, mis mõlemad iseloomustavad testi väga kõrget tundlikkust ja spetsiifilisust (joonis 8). Kasutades pp150-d2 antigeeni piirväärtust, on mudeli negatiivse proovi ennustamise väärtus (ingl *negative predictive value*; NPV) 1 ja positiivse proovi ennustamise väärtus (ingl *positive predictive value*; PPV) on 0,7143. pp150-d1 piirväärtus määrab kõik proovid CMV-positiivseteks, mistõttu ei ole PPV määratav, kuid

NPV on 0,9162. PPV ja NPV näitavad vastavalt päriselt positiivsete ja päriselt negatiivsete proovide osakaalu testiga määratud positiivsete ja negatiivsete proovide hulgas,

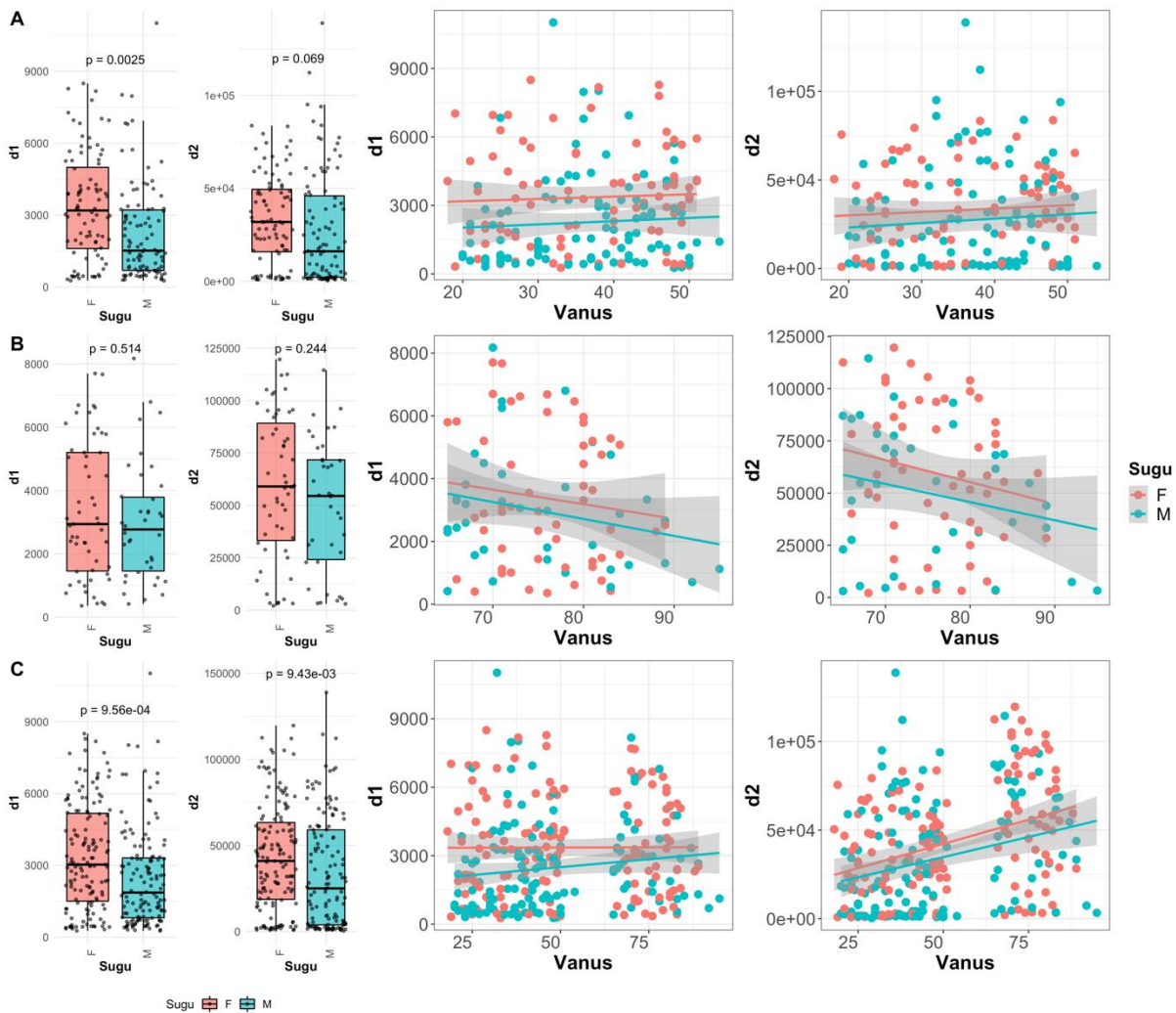
Uurisime, missugune oleks piirväärtus, kui kaasata nii pp150-d1 kui ka pp150-d2 LIPS-i tulemused. Selle jaoks kasutasime otsustuspuud (ingl *decision tree*). See näitas, et seropositiivsuse määramiseks peaks kasutama endiselt vaid pp150-d2 väärtust, kuid seadis piirväärtuse 7146 LU juurde. Selle piirväärtusega klassifitseeriti kõik proovid täpselt samal viisil nagu piirväärtusega 6924 LU, kuid uus piirväärtus on sellest hoolimata täpsem, sest selle leidmiseks on kasutatud ristvalideerimist. See tähendab, et mudelit treeniti tsükliliselt nii, et esiteks jaotati andmestik kümneks rühmaks ning seejärel jäeti iga tsükli puhul üks rühm ehk alamandmestik välja, mida kasutati mudeli testimiseks ning ülejäänut üheksat alamandmestikku kasutati mudeli treenimiseks.

Kuna otsustuspuu ei näita, kas pp150-d1 ja pp150-d2 vahel esineb mingisugune koosmõju ning kas mingitel juhtudel oleks kasu p150-d1 väärtuse kaasamisest, tegime selle analüüsimiseks üldistatud lineaarse mudeli, mis on tavalise lineaarse regressiooni mugandatud vorm. Kasutades nii pp150-d1 kui ka pp150-d2 tulemusi, leiti piirväärtus, kasutades *balanced accuracy*. Selle piiväärtuse korral on tundlikkus 1 ja spetsiifilisus 0,976, kuid see ei paranda oluliselt ROC-analüüsi abil loodud pp150-d2 mudelit.

3.5. CMV-vastaste antikehade tiitrid tõusevad vanusega

Tahtsime uurida, missugused erinevused CMV-spetsiifilistes antikehatiitrites esinevad noorte ja vanade inimeste vahel. Siinkohal keskendusime peamiselt kohortidesisesele ja kohortidevahelisele seerumi antikehatasemete võrdlemisele ning vanusest ja soost tingitud tiitrite erinevustele mõlema kohordi sees.

Nooremate inimeste CMV-vastased antikehatiitrid määrasime CTG proovide ning eakamate omad IGN proovide alusel. Seejuures jätsime arvestamata IGA valimi, kus haiguste kõrgest esinemissagedusest tingitud potentsiaalselt kõrgemaid või madalamaid antikehatasemeid on keeruline arvesse võtta ka mitmest regressiooni kasutades. Sugudevahelist LIPS-i väärtuste erinevust hindasin Wilcoxon'i testiga ning seejärel uurisin mitmest regressiooni kasutades vanuse ja soo mõju CMV-spetsiifilistele antikehatiitritele, mis võimaldab eraldiseisvate muutujate mõju hinnata (joonis 10).

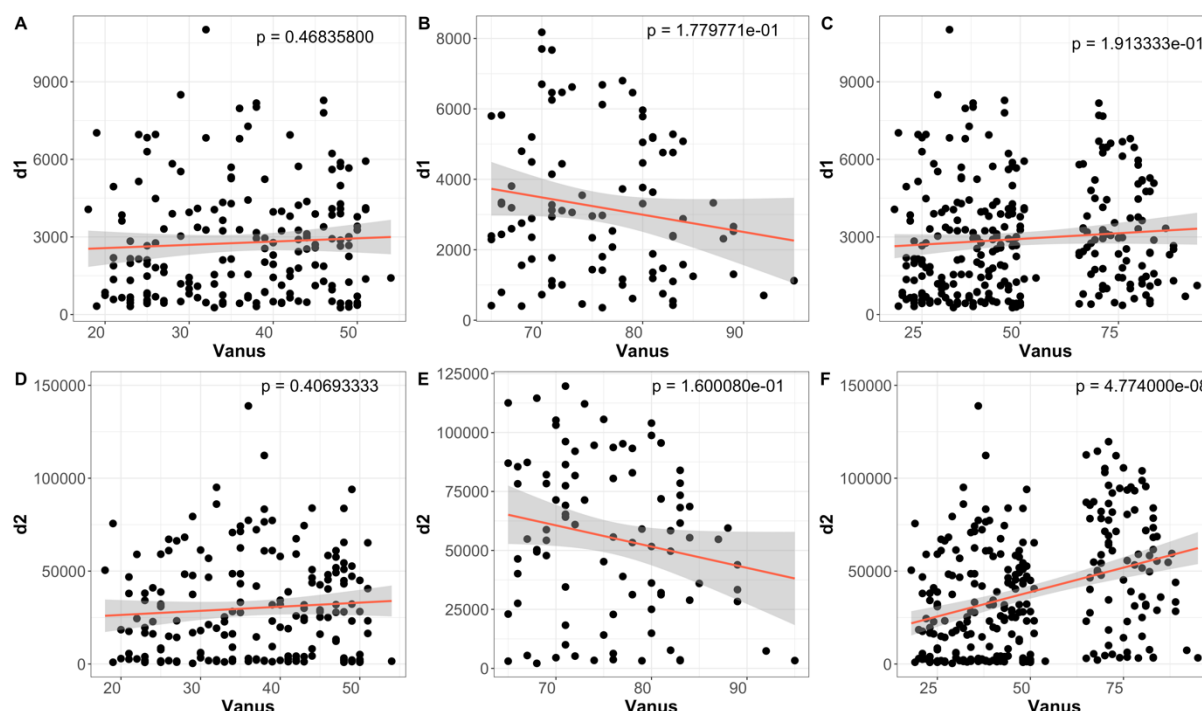


Joonis 10. Meeste (M) ja naiste (F) CMV-vastaste antikehastiitrite võrdlus ning antikehastiitrite regressioon vanusega mõlema soo suhtes (A) CTG, (B) IGN ja (C) IGN+CTG kohortides. A, B ja C kahel esimesel graafikul on kujutatud meeste ja naiste CMV-tiitrite võrdlust ning kaks viimast graafikut iseloomustavad korrelatsiooni vanuse ja CMV-spetsiifiliste antikehastiitrite vahel mõlema soo jaoks.

CTG valimis on meeste keskmine pp150-d1 väärtus 2260,5 LU (SD = 2043 LU) ja pp150-d2 väärtus 27273 LU (SD = 30167 LU). Naistel on vastavad suurused 3353,0 LU (SD = 2218 LU) ja 33187 LU (SD = 23705 LU). Wilcoxon'i testi alusel on selline CTG sugudevaheline erinevus statistiliselt oluline (joonis 10A), kuid see võib teatud ulatuses olla tingitud ka CMV-seronegatiivsete proovide erinevast jaotusest meeste ja naiste vahel. See tähendab, et juhul kui meeste hulgas on rohkem CMV-seronegatiivseid inimesi, keda siinses töös ei olnud võimalik valimist eemaldada, kui naiste seas, võivad meeste tugevalt madalamad tiitrid osaliselt ka sellest tingitud olla.

IGN kohordis on meeste pp150-d1 ja pp150-d2 väärtused vastavalt 2971 ± 1878 LU ja 49811 ± 31451 LU ning naiste omad 3366 ± 2153 LU ja 59347 ± 34360 LU. Kuigi naiste LIPS-i väärtused on mõlemal juhul kõrgemad, ei ole erinevus statistiliselt oluline (joonis 10A).

Tulenevalt CTG kohordisisesest kõrgest sugudevahelisest väärtuste erinevusest, on ka IGN+CTG valimis naiste väärtused meeste omadest kõrgemad (joonis 10C).



Joonis 11. CMV-vastaste antikehastiitrite seos vanusega CTG (A, D), IGN (B, E) ja IGN+CTG (C, F) valimites. Graafikutel on kujutatud pp150-d1 ja pp150-d2 spetsiifiliste antikehastiitrite korrelatsiooni vanusega. CTG (A, D) ja IGA (B, E) graafikud näitavad, et vanuse seost antikehastiitritega kohordisiseselt ei erine, see-eest on see olemas IGN+CTG (C, F) kohordis.

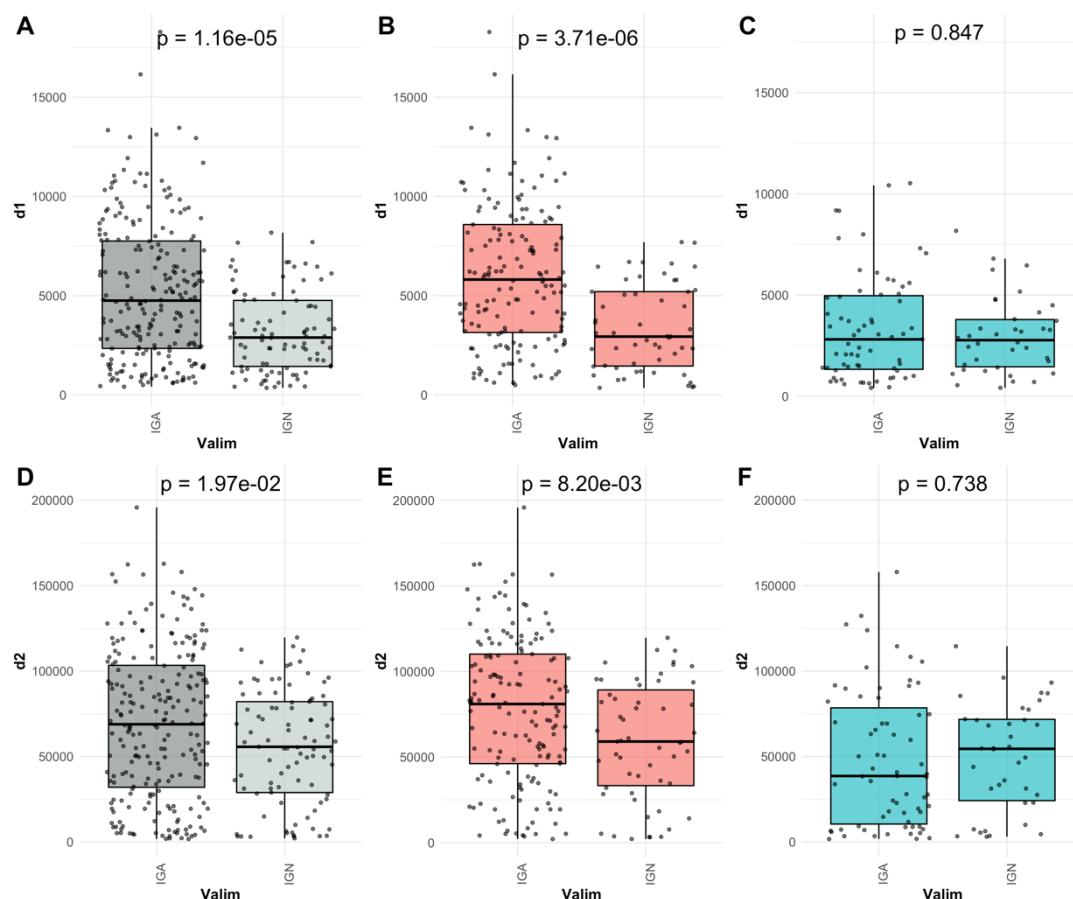
IGN valimis on nii pp150-d1 kui ka pp150-d2 antikehade tiitrid CTG valimi vastavatest näitajatest kõrgemad ($p_{pp150-d1} = 6,16 \times 10^{-2}$; $p_{pp150-d2} = 3,57 \times 10^{-9}$). Seejuures olid meestel nii pp150-d1 kui ka pp150-d2 väärtused märgatavalt suuremad kui CTG valimis ($p_{pp150-d1} = 1.484 \times 10^{-2}$; $p_{pp150-d2} = 1.153 \times 10^{-4}$), kuid naiste antikehastiitrid olid kõrgemad vaid CTG pp150-d2 väärtuste suhtes ($p_{pp150-d1} = 0,967$; $p_{pp150-d2} = 9,345 \times 10^{-6}$). Erinevus pp150-d1 ja pp150-d2 luminesentsväärtuste vahel võib osaliselt olla tingitud ka potentsiaalselt erinevast antikehade seondumisest pp150 peptiidil eri inimestel. Siin esitatud p-väärtused on arvutatud Wilcoxon testiga ja seejärel kohortidele vastavalt kohandatud.

IGA ja CTG kohordi väärtuste erinevuse põhjal oleks võimalik järeldada, et CMV-spetsiifilised antikehastiitrid vanusega tõusevad (joonis 10C ja 11F). See trend tuleb esile IGN+CTG kohordis terviklikult (joonis 11C, 11F) kui ka mõlema soo jaoks eraldi (vanuse p-väärtus $p_{pp150-d2} = 1,0967 \times 10^{-7}$, kui arvestada ka soo mõjuga), sest mõlemal juhul hakkavad pp150-d2 väärtused, mis iseloomustavad CMV-seropositiivsust paremini kui pp150-d1 tulemused, vanusega kasvama. Vanusega seotud CMV-spetsiifiliste antikehastiitrite kasvu kummaski valimis kohordisiseselt ei tekkinud (CTG: $p_{vanus_pp150-d1} = 0,4683$ ja $p_{vanus_pp150-d2} = 0,40693333$;

IGN: $p_{\text{vanus_pp150-d1}} = 0,1779$ ja $p_{\text{vanus_pp150-d2}} = 0,1600$) (joonised 10 ja 11), mille põhjal võib järeldada, et CMV-tiitrite vanuseline erinevus kujuneb välja alles pikema ajaperioodi jooksul.

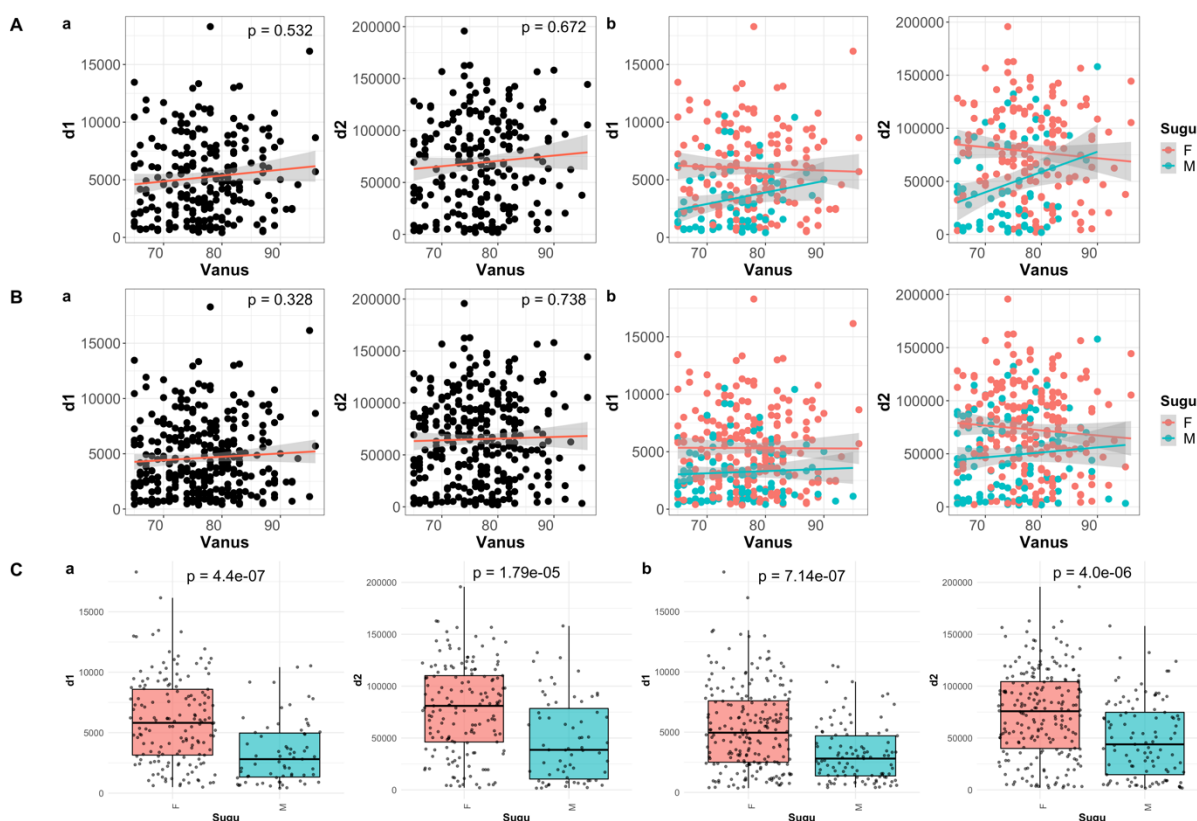
3.6. Haiguslikud seisundid soodustavad CMV-vastaste antikehastiitrite tõusu vananemisel

Töös kasutati kahte erinevat eakate (≥ 65 -aastased) inimeste kohorti, IGA ja IGN. Kohordis IGA oli inimestel märgatavalt suurema tõenäosusega diagnoositud mõni haigus ja seetõttu käsitlesime IGN kohorti kontrollgrupina. Et uurida, kas kohortide vahel esineb erinevusi, ja analüüsida, kas need erinevused võivad olla tingitud haiguste suuremast esinemissagedusest IGA kohordis, mõõtsin 93 IGN ja 224 IGA proovi CMV-spetsiifilisi antikehade tiitreid ning võrdlesin erinevusi vanuselises ja soolises jaotuses, pp150-d1 ja pp150-d2 väärtustes ning nende korrelatsioonides vanuse ja sooga.



Joonis 12. IGA ja IGN kohortide vaheline pp150-d1 ja pp150-d2 väärtuste erinevus. Graafikud A ja D kujutavad kõigi IGA ja IGN proovide pp150-d1 ja pp150-d2 väärtuste erinevust. B ja E ainult naiste omasid ning G ja F ainult meeste omi. Statistilist olulisust on iseloomustatud Wilcoxon'i testi p-väärtusega ($p < 0,05$ on arvestatud kui statistiliselt oluline).

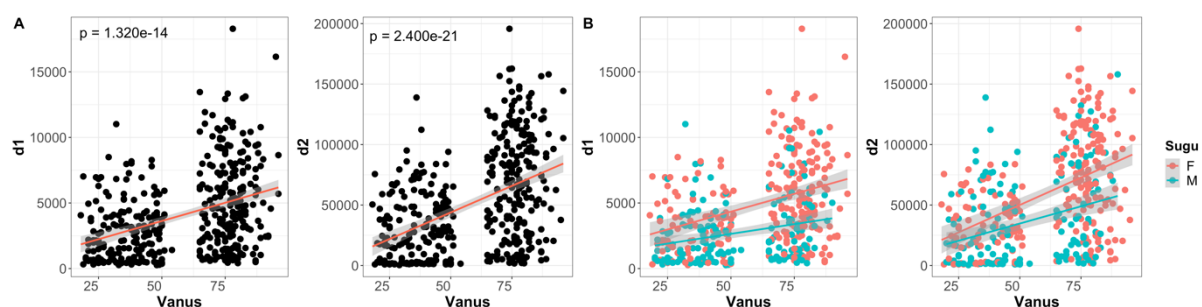
IGA kohordis olevate proovide CMV-spetsiifilised antikehastiitrid on statistiliselt oluliselt kõrgemad kui IGN kohordi omad (joonised 12A ja 12D). Kuna meestelt pärit proovide antikehastiitrite vahel märgatavat erinevust ei esinenud (joonised 12C ja 12F), on nende kahe kohordi CMV-vastaste antikehastiitrite erinevus kõige tõenäolisemalt tingitud kõrgematest naiste CMV-spetsiifiliste antikehade tasemetest IGA valimis (joonised 12B ja 12E). IGA ja IGN proovide väärtuste erinevus viitab võimalikule seosele konkreetsete haigusrühmade ja kõrgemate CMV-vastaste antikehastiitrite vahel.



Joonis 13. Ülevaade vanuse ja soo mõjust IGA ja IGA+IGN kohordi CMV-spetsiifilistele antikehastiitritele. A kujutab IGA kohordi proovide väärtuste seost vanusega (a) ja antikehastiitrite regressiooni vanusega mõlema soo suhtes (b). B graafikud on samad nagu A omad, aga IGA+IGN kohordi jaoks. C graafikud iseloomustavad meeste (0) ja naiste (1) pp150-d1 ja pp150-d2 väärtuste erinevust (a) IGA ja (b) IGA+IGN valimites, kus p-väärtused statistilise olulisuse hindamiseks on arvutatud Wilcoxon'i testi alusel ($p < 0,05$ on arvestatud kui statistiliselt oluline).

IGA kohordis, erinevalt IGN kohordist, on olemas statistiliselt oluline erinevus naiste ja meeste väärtuste vahel (joonis 13Ca) ning sugu säilitab statistilise olulisuse ka mudelis, mis lisaks soo mõjule arvestab ka vanusega ($p_{\text{sugu_pp150-d1}} = 1.995 \times 10^{-6}$; $p_{\text{sugu_pp150-d2}} = 2.415 \times 10^{-5}$) (joonis 13Ab). Arvestades ka sellega, et IGA ja IGN proovide väärtuste erinevus on tingitud vaid naiste kõrgematest antikehatasemetest IGA kohordis (joonised 12B ja 12E), võib oletada, et muud vanusega kaasnevad haiguslikud seisundid omavad naiste CMV-vastastele antikehatasemetele tugevamat mõju kui meeste omadele.

Nagu IGN kohordi puhul (joonis 10A), ei esine ka IGA valimis kohordisest vanusest tingitud LIPS-i väärtuste kasvu või langust (joonis 13A). Kuna valimisiselt ei ole seost CMV-spetsiifiliste antikehateitrite ja vanuse vahel mitte üheski kohordis, võib erinevus olla tingitud liiga väikesest kohordisest vanuselisest variatsioonist. Et hinnata pp150-d1 ja pp150-d2 väärtuste seost vanusega lõime uue andmestiku – IGA+CTG, mis koosnes IGA kohordist, millele oli liidetud CTG kohort ning võrdlesime seda olemasoleva IGN+CTG kohordiga. CTG proovide lisamine oli vajalik, et uurida laiemat vanusevahemikku. Soo, vanuse ja CMV-vastaste antikehateitrite vahelise seose hindamiseks tegin IGN+CTG ja IGA+CTG valimitele lineaarsed mudelid vanuse (joonis 10C, 10F (IGN+CTG) ja 13A (IGA+CTG)) ja CMV-spetsiifiliste antikehateitrite seosest, ning mitmese regressiooni LIPS-i väärtuste ja vanuse vahel mõlema soo suhtes (joonis 9C (IGN+CTG) ja 13B (IGA+CTG)).

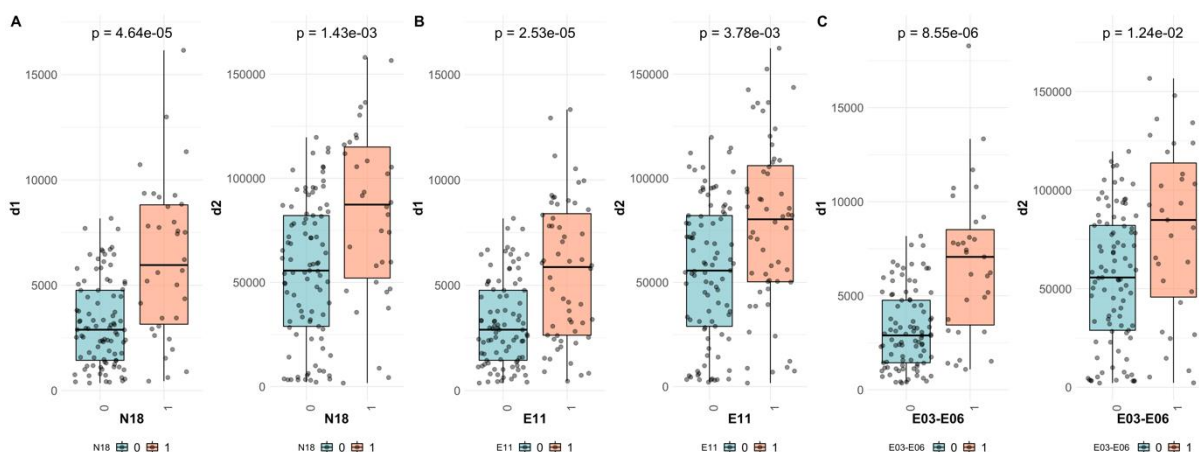


Joonis 14. IGA+CTG kohordi proovide pp150-d1 (A) ja pp150-d2 (B) väärtuste seos vanusega. Graafikutele A ja B on kujutatud lineaarne mudel vanuse ja CMV-spetsiifiliste antikehateitrite vahel. Graafikutele B on mitmese regressiooni mudelid CMV-vastaste antikehateitrite taseme ja vanusega mõlema soos suhtes (F – naised, M - mehed).

Vahepealse vanusevahemiku puudumise pärast võivad korrelatsioonid olla mingil määral ülehinnatud, kuid trendid on siiski selged ja piisavalt usaldusväärsed. Vanusega toimub CMV-vastaste antikehateitrite selge tõus, mis on näha nii IGN+CTG kui ka IGA+CTG valimite puhul, nii siis kui arvestada vaid vanusega (joonis 14A), kui ka juhul, mil arvestatakse nii soo kui ka vanusega (IGA+CTG: $p_{\text{vanus_pp150-d1}} = 1,956 \times 10^{-10}$ ja $p_{\text{vanus_pp150-d2}} = <1,0 \times 10^{-15}$). Seejuures on vanusel oluliselt suurem mõju IGA+CTG valimi jaoks, mis viitab, et teiste haiguslike seisundite esinemine võib tuua vananemisel kaasa ulatuslikuma CMV-vastase immuunvastuse ja seega kõrgemad antikehateitrid. On võimalik, et muud vananemisega kaasnevad haigused kiirendavad CMV-st tingitud T-rakkude diferentseerumist ja selle kaudu nõrgestavad üldist immuunvastust, mis viib sagedasema CMV reaktivatsiooni ning kõrgemate antikehateitriteni.

3.7. Kroonilisi põletikulisi haiguseid põdevatel inimestel on kõrgem CMV-vastaste antikehade tiiter

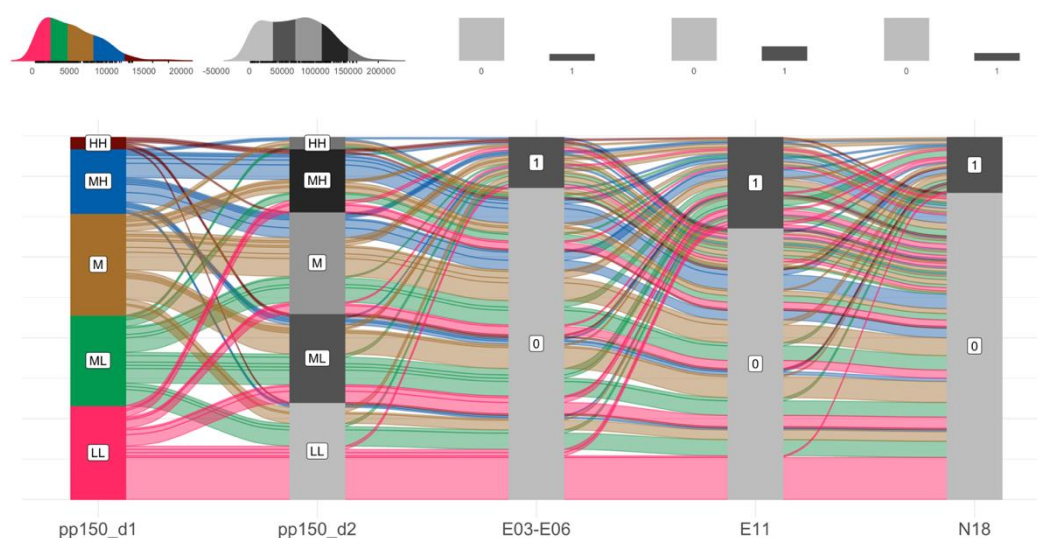
Soovisime analüüsida, kas IGA kohordi kõrgemad tulemused võivad olla tingitud mingitest kindlatest haigusrühmadest, mida need inimesed põevad. Selle jaoks tegime valimite üldistatud lineaarse mudeli (GLM), millega ennustasime erinevate põletikuliste haigusrühmade olemasolu inimeste pp150-d1 ja pp150-d2 LIPS-i luminescentsväärtuste, soo ja vanuse põhjal. See võimaldas hinnata seost haigusrühmades ja CMV-vastaste antikehade tiitrite vahel. Kuna haiguse olemasolu või puudumine on binaarne tunnus, ei sobi selle jaoks tavaline lineaarne mudel, vaid kasutatakse GLM-i. Uuritavaid haigusrühmasid oli kokku 24 ja need on loetletud siinse töö lisas 4.



Joonis 15. CMV pp150-d1 ja pp150-d2 LIPS-i väärtuste erinevus (A) kroonilise neerupuudulikkuse, (B) 2. tüüpi diabeedi ja (C) kilpnäärme seotud haiguslike seisunditega eakatel inimestel võrreldes inimestega, kellel neid haiguseid ei ole. Haiguseid põdevad inimesed (1) on pärit IGA kohordist ning neid on võrreldud IGN kohordi proovidega (0). Statistiline olulisus on määratud Wilcoxon'i testiga ($p < 0,05$ on arvestatud kui statistiliselt oluline erinevus).

Analüüside tulemusel tegime kindlaks kolm haigusrühma, mida põdevatel eakatel inimestel olid oluliselt kõrgemad CMV-spetsiifilised antikehade tiitrid kui inimestel, kellel neid haiguseid ei olnud (joonis 15). Need haigusrühmad olid krooniline neerupuudulikkus (N18), 2. tüüpi diabeet (E11) ja kilpnäärme seotud haiguslikud seisundid (E03–E06), nagu hüpotüreos, hüpertüreos, struuma ja kilpnäärmepõletik. Teiste haigusrühmadega konkreetset statistilist seost ei leitud. Lisaks Wilcoxon'i testi alusel määratud kõrgematele CMV-spetsiifiliste antikehade tiitritele haigete inimeste proovides, olid kõik haigusrühmad olulised ka GLM-mudelites, mis arvestasid lisaks ka vanusest ja soost tingitud erinevustega (N18 $p_{pp150-d1} = 2,0436 \times 10^{-5}$, $p_{pp150-d2} = 7,16 \times 10^{-4}$; E11 $p_{pp150-d1} = 1,274 \times 10^{-5}$, $p_{pp150-d2} = 1,482 \times 10^{-3}$; E03-E06 $p_{pp150-d1} = 1,806 \times 10^{-5}$; $p_{pp150-d2} = 9,461 \times 10^{-3}$).

Nende seoste visuaalseks iseloomustamiseks kasutasime *alluvial plot*'i (joonis 16), kus on näha, et märgatav osa inimesi, kellel on vähemalt üks neist haigusrühmadest, on keskmisest kõrgemate CMV pp150-d1 ja pp150-d2 väärtustega. Kuna suure tõenäosusega ei ole CMV ise kolme haigusrühma haiguste tekkepõhjus, vaid pigem mängib rolli nende üldises patoloogias ja mingil määral ka väljakujunemises, peaks seost CMV ja vananemisega seotud haiguste vahel iseloomustama madalate CMV tiitritega inimeste osakaalu kaudu, kellel vähemalt üks nendest haigustest olemas on. Oluliselt halvemini iseloomustab seost CMV ja vananemisega seotud haiguste vahel kõrgete CMV-vastaste antikehastiitritega inimeste osakaal, kellel pole ühtegi neist haigustest, sest suure tõenäosusega kõrged CMV-tiitrid haiguste esialgset väljakujunemist ei põhjusta, vaid lihtsalt soodustavad.

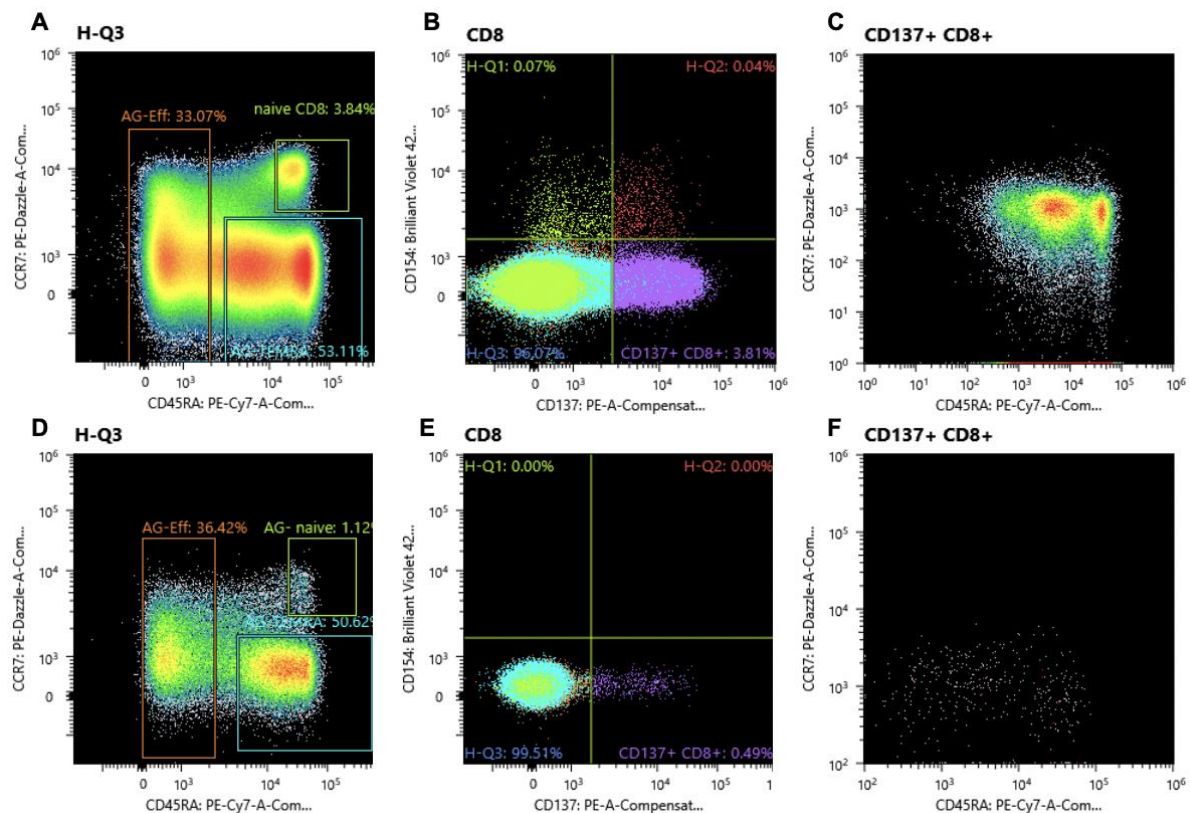


Joonis 16. CMV pp150-d1 ja pp150-d2 väärtuste seos kilpnäärmega seotud haigusseisundite (E03-E06), 2. tüüpi diabeedi (E11) ja kroonilise neerupuudulikkusega (N18). Kõik tulbad on jaotatud kahte või enamasse kategooriasse ning eri värvi vood iseloomustavad, kuidas on teatud rühmad omavahel seotud. CMV pp150-d1 ja pp150-d2 tulpades on jaotatud proovid nende luminestsentsväärtuste põhjal viide erinevasse rühma: HH (väga kõrge), MH (kõrge), M (keskmine), ML (madal) ja LL (väga madal) rühmadesse. Haigusrühmade tulpades on proovid jaotatud kahte rühma: haigust põdevad (1) ja terved (0) inimesed.

Nendele tulemustele toetudes võib järeldada, et muud haiguslikud seisundid võivad otseselt mõjutada eakate inimeste CMV-vastase immuunvastuse ulatust ja tugevust ning lisaks viitab see potentsiaalsele seosele teiste haiguste ja CMV reaktivatsiooni sageduse vahel.

3.8. Kõrged CMV-vastaste antikehade tiitrid on seotud tugevama rakulise immuunvastusega

Seni oleme eeldanud, et kõrgemad LIPS-iga mõõdetud CMV-spetsiifilised antikehastiitrid on otseselt seotud tugevama CMV-vastase immuunvastusega ning seetõttu ka ulatuslikuma T-rakkude diferentseerumise ja CMV-spetsiifiliste rakkude proliferatsiooniga. Selle eelduse kinnitamiseks valisime välja ühe kõrgemate ja ühe madalamate CMV-vastaste antikehastiitritega inimese IGA kohordist. Mõlemalt inimeselt saadud PBMC-sid stimuleeriti CMV(pp65) antigeeniseguga, seejärel viidi läbi FACS analüüs ja sorditi välja kummagi inimese CD8⁺ T_{EF}-rakud (joonised 17A, 17D), T_{EMRA}-rakud (joonised 17A, 17D), CD8⁺ T_N-rakud (joonised 17A ja 17D) ja CMV-spetsiifilised CD8⁺ CD137⁺ T-rakud (joonised 17B, 17C, 17E ja 17F).



Joonis 17. T-rakuline immuunvastus CMV antigeenidele. A ja D pildid kujutavad vastavalt kõrge ja madala pp150-d2 väärtusega proovist sorditud T_{EF}-rakkude, T_{EMRA}-rakkude ja CD8⁺ T_N-rakkude populatsioone ja osakaalu CD8⁺ T-rakkude populatsioonis. B ja E pildid iseloomustavad vastavalt tugeva ja nõrga proovi H-Q3 populatsiooni, millest on välja sorditud piltidel A ja D kujutatud rakupopulatsioonid, ning CMV-spetsiifiliste CD137⁺ CD8⁺ T-rakkude populatsiooni suurust ja osakaalu. Pildid C ja F kujutavad vastavalt tugevast ja nõrgast proovist sorditud CMV-spetsiifilist CD137⁺ CD8⁺ T-rakkude populatsiooni.

Märgatavat erinevust kõrgemate ja madalamate CMV-tiitritega proovide T_{EMRA}, T_N ja T_{EF}-rakkude populatsioonis ei esinenud. Siinses töös võib erinevuse puudumine olla tingitud

sellest, et need kolm rakupopulatsiooni ei ole CMV-spetsiifilised vaid kujutavad uuritud isiku kõigi T_{EMRA} -de, T_N -rakkude ja T_{EF} -rakkude arvu ning seetõttu tuleks CMV-st tingitud erinevuste analüüsimiseks arvestada ka mitmete muude faktoritega, näiteks teiste viirusinfektsioonide ja haiguslike seisunditega, mis samuti T-lümfotsüütide alampopulatsioonidele mõju avaldavad.

Siiski iseloomustab kõrgemate CMV-tiitritega proovi märgatavalt kõrgem CMV-spetsiifiliste $CD137^+ CD8^+$ rakkude arv (joonis 17B) võrreldes nõrgemate antikehastiitritega prooviga (joonis 17E) ja see viitab ka oluliselt tugevamale T-rakulisele immuunvastusele. Selle alusel on võimalik järeldada, et LIPS-i abil määratud kõrgemad CMV-spetsiifilised antikehastiitrid on otseselt seotud ka tugevama CMV-vastase immuunvastusega. Seetõttu on LIPS-i luminesentssväärtuste kasutamine CMV-infektsiooni kvantitatiivseks iseloomustamiseks, nagu seda on tehtud siinses töös, põhjendatud.

4. ARUTELU

Inimest nakatav CMV on herpesviirus, millega on nakatunud suurem osa elanikkonnast. Kuigi immuunsüsteem on enamasti võimeline CMV-infektsiooni edukalt kontrollima, kulub selleks suur hulk immuunsüsteemi ressursse, mille tulemusel vananedes üldine keha vastupanuvõime langeb. Selle tagajärjel on CMV-nakkust seostatud mitmete vananemisele iseloomulike haiguslike seisunditega, millest on suudetud kindlaks teha vaid mõned. (Griffiths *et al.*, 2015) Töö eesmärk oli ennekõike uurida kas ja kuidas on eakates inimestes kroonilised põletikulised haigused seotud CMV-vastaste antikehadega ning mil viisil mõjutavad vanus ja sugu nende antikehade taset. Selle eeldus oli CMV-spetsiifiliste antikehateitrite võimalikult täpne hindamine, mistõttu analüüsiti LIPS-i potentsiaalset rakendust CMV-nakkuse kvantitatiivseks ja kvalitatiivseks iseloomustamiseks.

CMV on väga ulatuslikult levinud ja seetõttu oli lisaks kvalitatiivsele seropositiivsuse määramisele vaja kvantitatiivselt hinnata infektsiooni tugevust, mida iseloomustab seerumi viirusspetsiifiliste antikehade kogus (Griffiths *et al.*, 2015). Viirusinfektsioonide kvantitatiivseks iseloomustamiseks on varem kasutatud näiteks ELISA-testi, immunoblotanalüüsi, valgukiipe ja LIPS-analüüsi. (Wertheimer *et al.*, 2014; Burbelo *et al.*, 2010; Burbelo *et al.*, 2009). Üks parimaid kasutusel olevaid kvantitatiivseid seroloogilisi teste ongi ELISA, kuid selles kasutatakse CMV määramiseks heterogeenset peptiidide segu, mis koosneb nii antigeensetest kui ka mitte-antigeensetest CMV-peptiididest, ning sellega kaasneb potentsiaalne teiste herpesviiruste-spetsiifiliste antikehade ristreaktiivsus. Lisaks on sel väikene määramispiirkond, sest kvantitatiivse analüüsi jaoks on vaja teha korduslahjenduste rida (Burbelo *et al.*, 2009). Sellest tulenevalt rakendati töös LIPS-i, mida on varem kasutatud kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega klassifitseerimismudelite loomisel (Burbelo *et al.*, 2009 HSV).

Töös mõõdeti antikehateitrit nelja CMV peptiidi suhtes: gB1, gB2, pp150-d1 ja pp150-d2. ROC-analüüsi teel saadud pp150-d1 ja pp150-d2 LIPS-i piirväärtused võimaldasid klassifitseerida proovid CMV-seropositiivsuse põhjal kõrge spetsiifilisuse (mõlemad 100%) ja tundlikkusega (vastavalt 89,6% ja 96,3%). Saadud klassifitseerimistulemused on vastavuses Burbelo *et al.* saadud näitajatega, kus klassifitseerimisel nii spetsiifilisus kui ka tundlikkus olid mõlema peptiidi puhul 100% (Burbelo *et al.*, 2009). Teatud varieeruvus võib olla tingitud siinses töös kasutatud proovide märgatavalt suuremast arvust. Analüüsi põhjal oli võimalik järeldada, et pp150-d2 iseloomustab CMV-seropositiivsust paremini ja seetõttu seonduvad sellega antikehad tugevamini. gB1 ja gB2 spetsiifilised antikehateitrid ei võimaldanud eristada CMV-

positiivseid ja -negatiivseid proove. See võib olla tingitud glükoproteiin B nelja genotüübiga viiruse (gB1, gB2, gB3, gB4) erinevast jaotusest ja kogusest inimestel. Seejuures esineb enamusel vaid üks või kaks gB genotüüpi korraga (Coaquette *et al.*, 2004). Selle põhjal võib väita, et kui kasutada gB-d CMV-seropositiivsuse määramisel, tuleks arvestada kõigi nelja genotüübiga.

CMV reaktivatsioon toimub elu jooksul mitmeid kordi ning aktiveerib lüütilisse tsükklisse sisenedes korduvalt keha immuunvastust (Crough, Khanna, 2009). Varem on näidatud, et vanuse ja progresseeruva CMV-infektsiooniga kaasnev kehvem immuunvastus tingib omakorda kõrgema viraalse replikatsiooni ja tihedama CMV reaktivatsiooni vanadel inimestel (Thomasini *et al.*, 2017). Töös leiti positiivne seos CMV-spetsiifiliste antikehastiitrite ja vanuse vahel ning samasugust korrelatsiooni on CMV IgG taseme ja vanuse vahel ka varasemates töödes kirjeldatud (Roberts *et al.*, 2010). Selle põhjal oleks mõistlik järeldada, et viirus-spetsiifiliste antikehade kogus on CMV reaktivatsiooniga otseselt seotud, sest CMV-spetsiifilisi antikehasid toodetakse iga lüütilise tsükli jooksul juurde ning vanadel inimestel on CMV reaktivatsioon jõudnud toimuda suurem arv kordi kui noortel.

Töös uuriti lisaks CMV-infektsiooni ja soo vahelist seost. Varem on näidatud, et naistel on kõrgemad CMV-vastased antikehastiitrid kui meestel, kuid ühest selgitust sellisele erinevusele ei ole leitud (Thomasini *et al.*, 2017; Czarnowska *et al.*, 2018). Samasugune seos suurema CMV-vastaste antikehade taseme ja soo vahel leiti ka siinses töös, kuid erinevus oli oluline vaid CTG ja IGA, aga mitte IGN kohordis. On teada, et naiste ja meeste immuunreaktsioon CMV-nakkusele ei ole samasugune: sekreteeritavad põletikulised ühendid ja muutused immuunrakkude alampopulatsioonides on erinevad (Di Benedetto *et al.*, 2019; van der Heiden *et al.*, 2016). CMV-positiivsetel naistel on oluliselt rohkem T_{reg} -rakke kui meestel ja vanusega suurenevat T_{reg} -ide arvu on seostatud tugevama immunosupressiooni ja nõrgema immuunvastusega vanades inimestes (Raynor *et al.*, 2012). Sellele toetudes ja arvestades, et sugudevaheline tiitrite erinevus on kõrge haiguste esinemissagedusega IGA kohordis märgatavalt suurem kui IGN kohordis, võivad naiste kõrgemad CMV-spetsiifiliste antikehade tasemed olla selgitatavad näiteks üldise põletikulise seisundi, konkreetsete haiguste esinemise või tugevama immunosupressiooni kaudu.

Üks siinse töö peamisi eesmärke oli uurida, kuidas on CMV seotud vananemisele iseloomulike krooniliste haigustega. Tihtilugu on välja pakutud, et CMV-st tingitud krooniline põletikuline seisund vanas eas mängib rolli haiguste patogeneesis ja progresseerumises (Blasko *et al.*, 1999). Siinses töös leiti statistiliselt oluline seos CMV ja kolme haigusrühma vahel, milleks olid krooniline neerupuudulikkus, 2. tüüpi diabeet ja kilpnäärmega seotud haiguslikud seisundid.

Varasematele töödele toetudes on teada, et CMV ja kroonilise neerupuudulikkuse vahel esineb konkreetne seos (Yang *et al.*, 2019). See on tingitud kõrvalekalletest T-rakkude alampopulatsioonides, mis on iseloomulikud nii kroonilise neerupuudulikkuse kui ka CMV-infektsiooniga inimestele (Chiu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019). Kuna nende muutuste tagajärjel nõrgeneb immuunvastus, on mõistlik oletada, et CMV reaktivatsioon toimub kroonilist neerupuudulikkust põdevatel inimestel tihedamini ja viib seega kõrgemate CMV-spetsiifiliste antikehastiitrite tekkimiseni.

Töös näidatud seos CMV ja teist tüüpi diabeedi (T2D) vahel kinnitab, et CMV infektsioon on tõepoolest seotud kõrgema diabeediriskiga, mida on varasemates töödes seostatud ka CMV-seropositiivsusega (Chen *et al.*, 2012). Siinses töös on võimalik lisaks CMV-seropositiivsusele siduda T2D ka kõrgemate CMV-vastaste antikehastiitritega, kuid selle põhjal ei ole võimalik öelda, kas diabeedile iseloomulikud sümptomid suurendavad CMV-tiitreid või CMV-infektsioon kiirendab T2D väljakujunemist. Arvatakse, et CMV-st tingitud pankreaserakkude kahjustused, mis muutuvad oluliseks alles vanemas eas, selgitavad, miks seos CMV ja T2D vahel on nähtav vaid eakatel inimestel (Smelt *et al.*, 2012). Chen *et al.* töös näidatakse, et seos tekib alles üle 85-aastastel inimestel, kuid siinse töö põhjal võib järeldada, et see võib muutuda oluliseks juba ~20 aastat varem (Chen *et al.*, 2012). Tulevikus oleks täpsema CMV ja T2D vahelise patoloogilise mehhanismi selgitamiseks kasulik võrrelda omavahel kvantitatiivseid CMV-tiitreid näitajatega, näiteks glükeeritud hemoglobiini tasemega, mis võimaldavad kvantitatiivselt iseloomustada T2D sümptomite tugevust.

Konkreetselt seost CMV ja kilpnäärmehaiguste vahel on varem näidatud üksikutes töödes. On teada, et tugevalt nõrgendatud immuunsüsteemiga inimestel on tuvastatud CMV-ga nakatunud rakke kilpnäärme epiteelis, kuid neil inimestel ei esinenud kilpnäärme funktsionaalseid kõrvalekaldeid (Frank *et al.*, 1987). CMV-seropositiivsetel autoimmuunse hüpotüreoidismi (*Hashimoto thyroiditis*; HT) patsientidel on oluliselt madalam lümfotsüütide arv, aga suurem CD28⁻ CD8⁺ T-rakkude arv, kui CMV-negatiivsetel HT patsientidel, kuid samas ei suudetud kindlaks teha, kui suur oli CMV tegelik roll HT patogeneesis (Prelog *et al.*, 2013). Taas lähtudes sellest, et CMV-st tingitud T-rakkude ulatuslik diferentseerumine tingib nõrgema immuunvastuse ja seega tihedama reaktivatsiooni, võib töös leitud kõrgemate CMV-spetsiifiliste antikehastiitrite ja kilpnäärmehaiguste vahelist seost selgitada tihedama CMV-reaktivatsiooniga. Samuti võib olla potentsiaalne seos CMV-st tingitud põletikulise seisundi ja kilpnäärme haiguste väljakujunemise vahel.

Kokkuvõtvalt näitavad tulemused, et CMV-infektsioon ja kõrgemad CMV-spetsiifilised antikehatasemed on seotud kilpnäärmega seotud haigusseisundite, T2D ja kroonilise

neerupuudulikkusega vanadel inimestel. Samuti kinnitas siinne töö, et CMV-vastastes antikehastiitrites esineb konkreetne sooline ja vanuseline erinevus.

KOKKUVÕTE

CMV on populatsioonis laialt levinud herpesviirus. Enamasti on CMV organismis mitteaktiivsena, kuid aeg-ajalt viirus inimese rakkudes taasactiveerub ja siis surub immuunsüsteem selle alla. Immuunsüsteem kontrollib aktiveerunud viirust, tekitades viirusele spetsiifilisi antikehasid ja T-rakulist immuunreaktsiooni. Kuna CMV-nakkusel on oluline mõju immuunsüsteemile, siis arvatakse, et selle infektsiooniga seotud immuunvastus mõjutab vanemates inimestes vastupanuvõimet teistele nakkustele ja ka krooniliste põletikuliste haiguste ilmnemist. Töös uurisime, kas ja kuidas on eakates inimestes kroonilised põletikulised haigused seotud CMV-vastaste antikehadega ning mil viisil mõjutavad vanus ja sugu nende antikehade taset.

Töös kasutasime kokku 503 inimese vereseerumeid ning hindasime antikehade taset, mis kaudselt iseloomustab CMV infektsiooni tugevust. Selle eeldus oli CMV-spetsiifiliste antikehateitrite võimalikult täpne hindamine, mistõttu analüüsisime LIPS-i potentsiaalset rakendust CMV-nakkuse kvantitatiivseks ja kvalitatiivseks iseloomustamiseks. Sõltuvalt proovidest analüüsisime CMV-infektsiooni seost vanuse, soo ja vananemisele iseloomulike haigustega ning jõudsime järgmistele järeldustele:

1. LIPS-i abil on võimalik lisaks kvalitatiivsele CMV-infektsiooni määramisele hinnata kvantitatiivselt CMV-vastaste antikehade taset märgatavalt laiemas mõõtmisvahemikus kui seda võimaldas varasem ELISA-põhine meetod;
2. vanusega CMV-vastaste antikehade tase tõuseb, mille alusel võib väita, et antikehade kogus on otseses seoses CMV korduva taasactiveerumisega elu jooksul;
3. naistel on kõrgem CMV-vastaste antikehade tase, mis näitab, et naiste immuunsüsteem reageerib CMV-infektsioonile tugevamalt;
4. haigetel naistel, erinevalt meestest, on rohkem CMV-vastaseid antikehasid kui tervetel, mis annab alust arvata, et vanusega kaasnevad haigused on seotud naiste CMV-vastase immuunvastuse tugevusega;
5. CMV-infektsioon ja kõrgem CMV-vastaste antikehade tase on seotud T2D, kroonilise neerupuudulikkuse ja kilpnäärmega seotud haigusseisunditega vanadel inimestel.

Edaspidi peaks tulemuste õigsuses veendumiseks tegema samad analüüsid ka mõne teise valimi peal. Samuti tulekus uurida CMV-vastaste antikehateitrite võimalikku rakendust biomarkerina eakate inimeste immuunintervise hindamiseks.

RESÜMEE

Vananemine on mitmetahuline protsess, millesse on kaasatud paljud rakulised ja molekulaarsed mehhanismid. Kui organism vananeb, toimuvad immuunsüsteemis mitmed kahjulikud muutused nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsuses, mis tingivad drastiliselt nõrgema immuunvastuse vanades inimestes võrreldes noortega. Püsiv tsütomegaloviiruse (CMV) infektsioon on üks immuunsüsteemi vananemist soodustav tegur, omades ulatuslikku mõju T-rakkude populatsioonile. Pikaajalise CMV-infektsiooni kontrolli all hoidmine vajab suurt hulka immuunressursse ja võib seetõttu tõsiselt nõrgestada peremeesorganismi immuunvastust. CMV-d on seostatud mitmete vananemisele iseloomulike haigustega, kuid seni on vaid üksikuid selliseid seoseid põhjalikumalt kirjeldatud.

Siinses töös näitame, et kõrgemad CMV-vastaste antikehade tiitrid on seotud mitmete krooniliste haigustega eakates inimestes. Leidsime, et inimesed, kellel on diagnoositud kas 2. tüüpi diabeet, krooniline neerupuudulikkus või kilpnäärmega seotud haigusseisund, omavad oluliselt kõrgemaid CMV-spetsiifilisi antikehastiitriteid võrreldes tervete kontrollidega. Lisaks, naistel on kõrgemad CMV-vastaste antikehade tiitrid kui meestel ja kõrgemad antikeha tasemed korreleeruvad positiivselt vanusega. Meie tulemused näitavad, et vananemisele iseloomulikud kroonilised haigused on seotud CMV-infektsiooniga ja kinnitavad varem kirjeldatud vanuse ja sooga seotud erinevusi CMV-spetsiifilistes antikehatasemetes.

Nende tulemuste kinnitamiseks on vaja teha edasisi vastavusuuringuid teistes haigete inimeste kohortidest, kuid seejuures viitavad need sellele, et anti-CMV antikehatase võib olla kasulik biomarker eakate inimeste immuunintervise hindamiseks.

TÄNUSÕNAD

Ennekõike sooviksin tänada enda juhendajat Pärt Petersoni võimaluse eest oma tööd uurimisrühmas teha ja ühtlasi olen tänulik tema igakülgse abi ja julgustuse eest ning võimaluste eest õppida. Samuti tänan südamest kõiki molekulaarpatoloogia uurimisrühma liikmeid, kes mind töö tegemise jooksul alati aitasid ja toetasid.

Erilised tänusõnad võlgnen Ahto Salumetsale, kes mind kannatlikult aitas andmeanalüüsi ja uue programmeerimiskeele õppimisega, ning Liis Haljasmäele, Anu Remmile, Kai Kisandile ja Maire Pihlapile, kes mind on juhendanud erinevate laboratoorsete tehnikate õppimisel, milleta poleks töö ilmavalgust näinud. Tänan ka Rudolf Bichelet ja Liina Tserelit, kes olid abiks töö kirjutamisel. Olen tänulik ka õpetaja Kersti Veskimetsale jätkuva innustuse eest.

KASUTATUD ALLIKAD

Adler, B., Scrivano, L., Ruzcics, Z., Rupp, B., Sinzger, C., Koszinowski, U. (2006) Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *Journal of General Virology* Vol. 87, Issue 9, lk 2451-2460.

Almanzar, G., Schwaiger, S., Jenewein, B., Keller, M., Herndler-Brandstetter, D., Würzner, R., Schönitzer, D., Grubeck-Loebenstien, B. (2005) Long-Term Cytomegalovirus Infection Leads to Significant Changes in the Composition of the CD8⁺ T-Cell Repertoire, Which May Be the Basis for an Imbalance in the Cytokine Production Profile in Elderly Persons. *Journal of Virology* Vol. 79, Issue 6, lk 3675-3683.

Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M. A., Papagano, L., Ogg, G. S., King, O., Lechner, F., Spina, C. A., Little, S., Havlir, D. V., Richman, D. D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A. J., Rowland-Jones, S. L. (2002) Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine* Vol. 8, lk 379-386.

Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D.G., Mandelboim, O. (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nature Immunology* Vol. 6, lk 515-523.

Aspinall, R., Del Giudice, G., Effros, R. B., Grubeck-Loebenstien, B., Sambhara, S. (2007) Challenges for vaccination in the elderly. *Immunity & Aging* Vol. 4, nr 9.

Baldick, C.J. Jr., Marchini, A., Patterson, C.E., Shenk, T. (1997) Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp71 (ppUL82) Enhances the Infectivity of Viral DNA and Accelerates the Infectious Cycle. *Journal of Virology* Vol. 71, Issue 6, lk 4400-4408.

Biolatti, M., Dell'Oste, V., Pautasso, S., Gugliesi, F., von Einem, J., Krapp, C., Jakobsen, M.R., Borgogna, C., Gariglio, M., De Andrea, M., Landolfo, S. (2018) Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING. *Journal of Virology* Vol. 92, Issue 6.

Blasko, I., Marx, F., Steiner, E., Hartmann, T., Grubeck-Loebenstien, B. (1999) TNF α plus IFN γ induce the production of Alzheimer β -amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB journal* Vol. 13, nr 1, lk 63-68.

Buchholz, V. R., Schumacher, T. N. M., Busch, D. H. (2016) T Cell Fate at the Single-Cell Level. Annual Reviews of Immunology Vol. 34, lk 65-92.

Burbelo, P. D., Ching, K. H., Bren, K. E., Iadarola, M. J. (2011) Searching for Biomarkers: Humoral Response Profiling With Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). Expert Review of Proteomics Vol. 8, Issue 3, lk 309-316.

Burbelo, P. D., Ching, K. H., Bush, E. R., Han, B. L., Iadarola, M. J. (2010) Antibody-profiling technologies for studying humoral responses to infectious agents. Expert Review of Vaccines Vol. 9, Issue 6, lk 567-578.

Burbelo, P. D., Ching, K. H., Klimavicz, C. M., Iadarola, M. J. (2009) Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). Journal of Visualized Experiments Vol. 32, lk 1549.

Burbelo, P. D., Goldman, R., Mattson, T. L. (2005) A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian-produced *Renilla*luciferase-antigen fusion proteins. BMS Biotechnology Vol. 5, nr 22.

Burbelo, P. D., Hoshino, Y., Leahy, H., Krogmann, T., Hornung, R. L., Iadarola, M. J., Cohen, J. I. (2009) Serological Diagnosis of Human Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 Infections by Luciferase Immunoprecipitation System Assay. Clinical and Vaccine Immunology Vol. 16, Issue 3, lk 366-371.

Burbelo, P. D., Issa, A. T., Ching, K. H., Exner, M., Drew, W. L., Alter, H. J., Iadarola, M. J. (2009) Highly quantitative serological detection of anti-cytomegalovirus (CMV) antibodies. Virology Journal, nr 6, artikkel 45.

Burbelo, P. D., Lebovitz, E. E., Notkins, A. L. (2015) Luciferase Immunoprecipitation Systems for Measuring Antibodies in Autoimmune and Infectious Diseases. Translational Research, nr 165(2), lk 325-335.

Burke, H.G., Heldwein, E.E. (2015) Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. PLOS Pathogens Vol. 11, Issue 10.

Campisi, J. (2013) Aging, Cellular Senescence, and Cancer. Annual Reviews of Physiology Vol. 75, lk 685-705.

Cannon, M. J., Hyde, T. B., Schmid, D. S. (2011) Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance in congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology* Vol. 21, Issue 4, lk 240-255.

Capece, D., Verzella, D., Tessitore, A., Alesse, E., Capalbo, C., Zazzeroni, F. (2018) Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- κ B. *Seminars in Cell and Developmental Biology* Vol. 78, lk 51-61.

Charpak-Amikam, Y., Kubsch, T., Seidel, E., Oikine-Dijan, E., Cavaletto, N., Yamin, R., Schmiedel, D., Wolf, D., Gribaudo, G., Messerle, M., Cicin-Sain, L., Mandelboim, O. (2017) Human cytomegalovirus escapes immune recognition by NK cells through the downregulation of B7-H6 by the viral genes US18 and US20. *Scientific Reports* Vol. 7, nr 8661.

Chen, S., de Craen, A. J. M., Raz, Y., Derhovanessian, E., Vosse, A. C., Westendorp, R. G., Pawelec, G., Maier, A. B. (2012) Cytomegalovirus seropositivity is associated with glucose regulation in the oldest old. Results from the Leiden 85-plus Study. *Immunity & Ageing* Vol. 9, Issue 1, lk 18.

Chiu, Y., Shu, K., Yang, F., Chou, T., Chen, P., Lay, F., Lin, C., Litjens, N. H. R., Betjes, M. G. H., Bermudez, S., Kao, K., Chia, J., Wang, G., Peng, Y., Chuang, Y. (2018) A comprehensive characterization of aggravated aging-related changes in T lymphocytes and monocytes in end-stage renal disease: the iESRD study. *Immunity & Ageing* Vol. 15, no 27.

Coquette, A., Bourgeois, A., Dirand, C., Varin, A., Chen, W., Herbein, G. (2004) Mixed Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Immunocompromised Patients. *Clinical Infectious Diseases* Vol. 39, Issue 2, lk 155-161.

Cohen, J. I., Ali, M. A., Bayat, A., Steinberg, S. P., Park, H., Gershon, A. A., Burbelo, P. D. (2014) Detection of Antibodies of Varicella-Zoster Virus in Recipients of the Varicella Vaccine by Using a Luciferase Immunoprecipitation System Assay. *Clinical and Vaccine Immunology* Vol. 21, Issue 9, lk 1288-1291.

Compton, T., Nowlin, D.M., Cooper, N.R. (1993) Initiation of Human Cytomegalovirus Infection Requires Initial Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate. *Virology* Vol. 193, Issue 2, lk 834-841.

Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S., Longnecker, R. (2011) Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature Reviews Microbiology*, nr 9, lk 369-381.

Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., Campisi, J. (2014) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* Vol. 5, 1k 99-118.

Crooke, S. N., Ovsyannikova, I. G., Poland, G. A., Kennedy, R. B. (2019) Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immunity & Ageing* Vol. 16, nr 25.

Crough, T., Khanna, R. (2009) Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 22, Issue 1, 1k 76-98.

Czarnowska, A., Kapica-Topczewska, K., Zajkowska, O., Świerzbńska, R., Chorąży, M., Tarasiuk, J., Zajkowska, J., Kochanowicz, J., Kułakowska, A. (2018) Herpesviridae Seropositivity in Patients With Multiple Sclerosis: First Polish Study. *European Neurology* Vol. 80, Issue 5-6, 1k 229-235.

Daste, A., Domblides, C., Grouss-goupil, M., Chakiba, C., Quivy, A., Cochin, V., de Mones, E., Larmonier, N., Soubeyran, P., Ravaud, A. (2017) Immune checkpoint inhibitors and elderly people: A review. *European Journal of Cancer* Vol. 82, 1k 155-166.

Deng, Y., Jing, Y., Campbell, A. E., Gravenstein, S. (2004) Age-Related Impaired Type I T Cell Responses to Influenza: Reduced Activation Ex Vivo, Decreased Expansion in CTL Culture In Vitro, and Blunted Response to Influenza Vaccination In Vivo in the Elderly. *The Journal of Immunology* Vol. 172, Issue 6, 1k 3437-3446.

Derhovanessian, E., Maier, A. B., Beck, R., Jahn, G., Hähnel, K., Slagboom, P. E., de Craen, A. J. M., Westendorp, G. J., Pawelec, G. (2010) Hallmark Features of Immunosenescence Are Absent in Familial Longevity. *The Journal of Immunology* Vol. 185, Issue 8, 1k 4618-4624.

Di Benedetto, S., Gaetjen, M., Müller, L. (2019) The Modulatory Effect of Gender and Cytomegalovirus-Seropositivity on Circulating Inflammatory Factors and Cognitive Performance in Elderly Individuals. *International Journal of Molecular Sciences* Vol. 20, Issue 4, 1k 990.

Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevsa, T., Klotz, S., Medina-Echeverz, J., Longerich, T., Forgues, M., Reisinger, F., Heikenwalder, M., Wang, X. W., Zender, L., Greten, T. F. (2016) Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* Vol. 30, Issue 4, 1k 533-547.

Elder, E., Sinclair, J. (2019) HCMV latency: what regulates the regulators? *Medical Microbiology and Immunology* Vol. 208, 1k 431-438.

Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., Bluestone, J. A. (2016) CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* Vol. 44, Issue 5, lk 973-988.

Firth, C., Harrison, R., Ritchie, S., Wardlaw, J., Ferro, C. J., Starr, J. M., Deary, I. J., Moss, P. (2016) Cytomegalovirus infection is associated with an increase in systolic blood pressure in older individuals. *QJM* Vol. 109, Issue 9, lk 595-600.

Frank, T. S., LiVolsi, V. A., Connor, A. M. (1987) Cytomegalovirus infection of the thyroid in immunocompromised adults. *Yale Journal of Biology and Medicine* Vol. 60, Issue 1, lk 1-8.

Frasca, D., Landin, A. M., Lechner, S. C., Ryan, J. G., Schwartz, R., Riley, R. L., Blomberg, B. B. (2008) Aging Down-Regulates the Transcription Factor E2A, Activation-Induces Cytidine Deaminase, and Ig Class Switch in Human B Cells. *The Journal of Immunology* Vol. 180, Issue 8, lk 5283-5290.

Fülöp, T., Dupuis, G., Witkowski, J. M., Larbi, A. (2016) The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. *Revista de Investigación Clínica* Vol. 68, lk 84-91.

Fülöp, T., Larbi, A., Dupuis, G., Le Page, A., Frost, E.H., Cohen, A.A., Witkowski, J.M., Franceschi, C. (2018) Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology* Vol. 8, lk 1960 a.

Fülöp, T., Witkowski, J. M., Oliveri, F., Larbi, A. (2018) The integration of inflammaging in age-related diseases. *Seminars in Immunology* Vol 40., lk 17-35.

Goronzy, J., Weyand, C. M. (2017) Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity* Vol. 46, Issue 3, lk 364-378.

Goronzy, J.J., Weyand, C.M. (2003) Ageing, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity – catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* Vol. 5, Issue 5, lk 225- 234.

Goronzy, J.J., Weyand, C.M. (2012) Immune aging and autoimmunity. *Cellular and Molecular Life Sciences* Vol. 69, Issue 10, lk 1615-1623.

Goronzy, J.J., Weyand, C.M. (2013) Understanding immune senescence to improve vaccine responses. *Nature Immunology* Vol. 14, Issue 5, lk 428-436.

Grey, F., Meyers, H., White, E. A., Spector, D. H., Nelson, J. (2007) A Human Cytomegalovirus-Encoded microRNA Regulates Expression of Multiple Viral Genes Involved in Replication. *PLOS Pathogens* Vol. 3, nr 11.

Griffiths, P., Baraniak, I., Reeves, M. (2015) The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of Pathology* Vol. 235, Issue 2, lk 288-297.

Grolleau-Julius, A., Ray, D., Yung, R.L. (2010) The Role of Epigenetics in Aging and Autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* Vol. 39, Issue 1, lk 42-50.

Gyulai, Z., Endersz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cov, W. I., Meric, C., Plotkin, S., Gönczöl, E., Berencsi, K. (2000) Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses to Human Cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in Healthy Individuals: Reevaluation of Prevalence of IE1-Specific CTLs. *The Journal of Infectious Diseases* Vol. 181, Issue 5, lk 1537-1546.

Heldwein, E. E. (2016) gH/gL supercomplexes at early stages of herpesvirus entry. *Current Opinion in Virology* Vol. 18, lk 1-8.

Isomura, H., Stinski, M. F. (2003) The human cytomegalovirus major immediate-early enhancer determines the efficiency of immediate-early gene transcription and viral replication in permissive cells at low multiplicity of infection. *Journal of Virology* Vol. 77, Issue 6, lk 3602-3614.

Jackson, S. E., Mason, G. M., Wills, M. R. (2011) Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Research* Vol. 157, Issue 2, lk 151-160.

Jenkins, C., Abendroth, A., Slobedman, B. (2004) A Novel Viral Transcript with Homology to Human Interleukin-10 Is Expressed during Latent Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of Virology* Vol. 78, Issue 3, lk 1440-1447.

Jergović, M., Smitley, M. J., Nikolich-Žugich, J. (2018) Intrinsic and extrinsic contributors to defective CD8⁺ T cell responses with aging. *Experimental Gerontology* Vol. 105, lk 140-145.

Kalejta, R.F. (2008) Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 72, Issue 2, lk 249-265.

Kalejta, R.F., Bechtel, J.T., Shenk, T. (2003) Human Cytomegalovirus pp71 Stimulates Cell Cycle Progression by Inducing the Proteasome-Dependent Degradation of the Retinoblastoma Family of Tumor Suppressors. *Molecular and Cellular Biology* Vol. 23, Issue 6, lk 1885-1895.

Kari, B., Gehrz, R. (1992) A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *Journal of Virology* Vol. 66, Issue 3, lk 1761-1764.

Khan, N., Hislop, A., Gudgeon, N., Cobbold, M., Khanna, R., Nayak, L., Rickinson, A. B., Moss, A. H. (2004) Herpesvirus-Specific CD8 T Cell Immunity in Old Age: Cytomegalovirus Impairs the Response to a Coresident EBV Infection. *The Journal of Immunology* Vol. 173, Issue 12, 7481-7489.

Klenerman, P., Oxenius, A. (2016) T Cell Responses to Cytomegalovirus. *Nature Reviews Immunology* Vol. 16, Issue 6, 367-377.

Krzyzaniak, M., Mach, M., Britt, W.J. (2007) The Cytoplasmic Tail of Glycoprotein M (gpUL100) Expresses Trafficking Signals Required for Human Cytomegalovirus Assembly and Replication. *Journal of Virology* Vol. 81, Issue 19, 10316-10328.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (Beta)-Galactosidase Reflects an Increase in Lysosomal Mass During Replicative Ageing on Human Endothelial Cells. *Journal of Cell Science* Vol. 113, 3613-3622.

LaMaoult, J., Messaoudi, I., Manavalan, J. S., Potvin, H., Nikolich-Zugich, D., Dyal, R., Szabo, R., Weksler, M. E., Nikolich-Zugich, J. (2000) Age-Related Dysregulation in CD8 T Cell Homeostasis: Kinetics of a Diversity Loss. *The Journal of Immunology* Vol. 165, Issue 5, 2367-2373.

Lambotin, M., Raghuraman, S., Stoll-Keller, F., Baumert, T. F., Barth, H. A. (2010) Look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature Reviews Microbiology* Vol. 8, Issue 5, 350-360.

LaRosa, D. F., Orange, J. S. (2008) 1. Lymphocytes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 121, Issue 2, 364-369.

Lemster, B. H., Michel, J. J., Montag, D. T., Paat, J. J., Studenski, S. A., Newman, A. B., Vallejo, A. N. (2008) Induction of CD56 and TCR-Independent Activation of T Cells with Aging. *The Journal of Immunology* Vol. 180, Issue 3, 1979-1990.

Lindau, P., Mukherjee, R., Gutschow, M. V., Vignali, M., Warren, E. H., Riddell, S. R., Makar, K. W., Turtle, C. J., Robins, H. S. (2019) Cytomegalovirus Exposure in the Elderly Does Not Reduce CD8 T Cell Repertoire Diversity. *The Journal of Immunology* Vol. 202, Issue 2, 476-483.

Lu, Q., Kaplan, M., Ray, D., Ray, D., Zacharek, S., Gutsch, D., Richardson, B. (2002) Demethylation of ITGAL (CD11a) Regulatory Sequences in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology* Vol. 46, Issue 5, 1282-1291.

Lythe, G., Callard, R. E., Hoare, R. L. (2016) How many TCR clonotypes does a body maintain? *Journal of Theoretical Biology* Vol. 389, lk 214-224.

Mackall, C.L., Bare, C.V., Granger, L.A., Sharrow, S.O., Titus, J.A., Gress, R.E. (1996) Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *The Journal of Immunology* Vol. 156, Issue 12, lk 4609-4616.

Malissen, B., Bongrand, P. (2015) Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. *Annual Review of Immunology* Vol. 33, lk 539-561.

Marandu, T., Dombek, M., Cook, C. H. (2019) Impact of cytomegalovirus load on host response to sepsis. *Medical Microbiology and Immunology* Vol. 208, lk 295-303.

Marin, L. J., Cardoso, E. S. C., Sousa, S. M. B., Carvalho, L. D., Filho, M. F. M., Raiol, M. R., Gadelha, S. R. (2016) Prevalence and clinical aspects of CMV congenital Infection in a low-income population. *Virology Journal* Vol. 13, nr 148.

Mattes, F. M., Mc Lauglin, J. E., Emery, V. C., Clark, D. A., Griffiths, P. D. (2000) Histopathological detection of owl's eye inclusions is still specific for cytomegalovirus in the era of human herpesvirus 6 and 7. *Journal of Clinical Pathology* Vol. 53, lk 612-614.

Moxham, V. F., Karegli, J., Phillips, R. E., Brown, K. L., Tapmeier, T. T., Hangartner, R., Sacks, S. H., Wong, W. (2008) Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *The Journal of Immunology* Vol. 180, Issue 6, lk 3910-3918.

Najarro, K., Nguyen, H., Chen, G., Alcorta, S., Yao, X., Zukley, L., Metter, E. J., Troung, T., Lin, Y., Li, H., Oelke, M., Xu, X., Ling, S. M., Longo, D. L., Schneck, J., Leng, S., Ferrucci, L., Weng, N. (2015) Telomere Length as an Indicator of the Robustness of B- and T-Cell Response to Influenza in Older Adults. *The Journal of Infectious Diseases* Vol. 212, Issue 8, lk 1261-1269.

Nicoll, M. P., Proença, J. T., Efstathiou, S. (2012) The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiology Reviews* Vol. 36, Issue 3, lk 684-705.

Nikolich-Zugich, J. (2014) Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories. *The Journal of Immunology* Vol. 193, Issue 6, lk 2622-2629.

Nikolich-Žugich, J. (2017) Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nature Reviews Immunology* Vol. 8, Issue 7, lk 512-522.

Nikolich-Žugich, J. (2018) The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nature Immunology* Vol. 19, Issue 1, lk 10-19.

Noureddine, H., Gary-Bobo, G., Alifano, M., Marcos, E., Saker, M., Vienne, N., Amsellem, V., Maitre, B., Chaouat, A., Chouaid, C., Dubois-Randé, J., Damotte, D., Adnot, S. (2011) Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circulation Research* Vol. 109, Issue 5, lk 543-553.

Odeberg, J., Plachter, B., Brandén, L., Söderberg-Nauclér, C. (2003) Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR α -chain. *Blood* Vol. 101, Issue 12, lk 4870-4877.

Oh, S., Lee, J. K., Shin, O. S. (2019) Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity. *Immune Network* Vol. 19, Issue 6, lk 1-18.

Paludan, S. R., Bowie, A. G., Horan, K. A., Fitzgerald, K. A. (2011) Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, nr 11, lk 143-154.

Pawelec, G. (2017) Immunosenescence and cancer. *Biogerontology* Vol. 18, lk 717-721.

Picarda, G., Benedict, C. A. (2018) Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System. *Loetud: The Journal of Immunology* Vol. 200, Issue 12, lk 3881-3889.

Pinti, M., Appay, V., Campisi, J., Frasca, D., Fülöp, T., Sauce, D., Larbi, A., Weinberger, B., Cossarizza, A. (2016) Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *European Journal of Immunology* Vol. 46, Issue 10, lk 2286-2301.

Posnett, D. N., Sinha, R., Kabak, S., Russo, C. (1994) Clonal Populations of T Cells in Normal Elderly Humans: The T Cell Equivalent to "Benign Monoclonal Gammopathy". *Journal of Experimental Medicine* Vol. 179, Issue 2, lk 609-618.

Prelog, M., Schönlaub, J., Würzner, R., Koppelstaetter, C., Almanzar, G., Brunner, A., Gasser, M., Prommegger, R., Häusler, G., Kapelari, K., Högl, W. (2013) Lower CD28+ T cell proportions were associated with CMV-seropositivity in patients with Hashimoto's thyroiditis. *BMC Endocrine Disorders* Vol. 13, nr 34.

- Prösch, S., Wendt, C. E. C., Reinke, P., Preimer, C., Oppert, M., Krüger, D. H., Volk, H., Döcke, W. (2000) A Novel Link between Stress and Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection: Sympathetic Hyperactivity Stimulates HCMV Activation. *Virology* Vol. 272, Issue 2, lk 357-365.
- Pulko, V., Davies, J. S., Martinez, C., Lanteri, M. C., Busch, M. P., Diamond, M. S., Knox, K., Bush, E. C., Sims, P. A., Sinari, S., Billheimer, D., Haddad, E. K., Murray, K. O., Wertheimer, A. M., Nikolich-Zugich, J. (2016) Human memory T cells with a naive phenotype accumulate with aging and respond to persistent viruses. *Nature Immunology* Vol. 17, Issue 8, lk 966-975.
- Quyang, Q., Wagner, W. M., Wikby, A., Walter, S., Aubert, G., Dodi, A. I., Travers, P., Pawelec, G. (2003) Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope. *Journal of Clinical Immunology* Vol. 23, Issue 4, lk 247-257.
- Rafailidis, P. I., Mourtzoukou, E. G., Varbobitis, I. C. (2008) Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology Journal* Vol. 5, nr 47.
- Raynor, J., Lages, C. S., Shehata, H., Hildeman, D. A., Chougnet, C. A. (2012) Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Current Opinion in Immunology* Vol. 24, Issue 4, lk 482-487.
- Roberts, E. T., Haan, M. N., Dowd, J. B., Aiello, A. E. (2010) Cytomegalovirus Antibody Levels, Inflammation, and Mortality Among Elderly Latinos Over 9 Years of Follow-up. *American Journal of Epidemiology*, Vol. 172, Issue 4, lk 363-371.
- Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, R., Campeau, E., Davalos, A. R., Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology* Vol. 11, lk 973-979.
- Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., McCluskey, J. (2015) T Cell Antigen Receptor Recognition of Antigen-Presenting Molecules. *The Annual Review of Immunology* Vol. 33, lk 169-200.
- Sapey, E., Greenwood, H., Walton, G., Mann, E., Love, A., Aaronson, N., Insall, R. H., Stockley, R. A., Lord, J. M. (2014) Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood* Vol. 123, Issue 2, lk 239-248.

Sehrawat, S., Kumar, D., Rouse, B. T. (2018) Herpesviruses: Harmonious Pathogens but Relevant Cofactors in Other Diseases? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* Vol. 8, nr 177.

Simanek, A. M., Dowd, J. B., Pawelec, G., Melzer, D., Dutta, A., Aiello, A. E. (2011) Seropositivity to Cytomegalovirus, Inflammation, All-Cause and Cardiovascular Disease-Related Morality in the United States. *PLOS One* Vol. 6, Issue 2.

Sinclair, J. H., Reeves, M. B. (2013) Human Cytomegalovirus Manipulation of Latently Infected Cells. *Viruses* Vol. 5, Issue 11, lk 2803-2824.

Slobedman, B., Mocarski, E., Arvin, A. M., Mellins, E. D., Abendroth, A. (2002) Letent cytomegalovirus down-regulates major histocompatibility complex class II expression on myeloid progenitors. *Blood* Vol. 100, Issue 8, lk 2867-2873.

Smelt, M. J., Faas, M. M., de Haan, B. J., Draijer, C., Hugenholtz, G. C. G., de Haan, A., Engelse, M. A., de Koning, E. J. P., de Vos, P. (2012) Susceptibility of Human Pancreatic β Cells for Cytomegalovirus Infection and the Effects on Cellular Immunogenicity. *Pancreas* Vol. 41, Issue 1, lk 39-49.

Son, N. H., Murray, S., Yanovski J., Hodes, R. J., Weng, N. (2000) Lineage-Specific Telomere Shortening and Unaltered Capacity for Telomerase Expression in Human T and B Lymphocytes with Age. *The Journal of Immunology* Vol. 165, Issue 3, lk 1191-1196.

Sotsiaalministeeriumi kodulehekülj. Rahvusvaheline Haiguste Klassifikatsioon RHK-10. Kättesaadav: <https://rhk.sm.ee/>, 27.11.2019.

Stein, J., Volk, H., Liebenthal, C., Krüger, D. H., Prösch, S. (1993) Tumour necrosis factor stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhance/promoter in immature monocytic cells. *Journal of General Virology* Vol. 74, nr 11, lk 2333-2338.

Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V. T. K., Hein, M. Y., Huang, S., Ma, M., Shen, M., Qian, S., Hengel, H., Mann, M., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. (2012) Decoding Human Cytomegalovirus. *Science* Vol. 338, Issue 6610, lk 1088-1093.

Surh, C. D., Sprent, J. (2000) Homeostatic T cell proliferation: how war can T cells be activated to self-ligands? *Journal of Experimental Medicine* Vol. 192, Issue 4, lk 9-14.

Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P.R., Grabstein, K.H., Hosken, N.A., Kern, F., Nelson, J.A., Picker, L.J. (2005) Broadly targeted human

cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine* Vol. 202, Issue 5, 673-685.

Thomasini, R. L., Pereira, D. S., Pereira, F. S. M., Mateo, E. C., Mota, T. N., Guimarães, G. G., Pereira, L. S. M., Lima, C. X., Teixeira, M. M., Texeira, A. L., Junior (2017) Aged-associated cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. *PLoS One* Vol. 12, Issue 7.

Tomitschen III, J. P. (2012) Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal* Vol. 9, nr 22.

van der Heiden, M., van Zelm, M. C., Bartol, S. J. W., de Rond, L. G. H., Berbers, G. A. M., Boots, A. M. H., Buisman, A. M. (2016) Differential effects of Cytomegalovirus carriage on the immune phenotype of middle-aged males and females. *Scientific Reports* Vol. 6.

Varnum, S. M., Strelbow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Paša-Tolić, L., Wang, D., Camp II, D. G., Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D., Nelson, J. A. (2004) Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *Journal of Virology* Vol. 78, nr 20, 10960-10966.

Verma, K., Ogonek, J., Varansi, P. R., Luther, S., Bünting, I., Thomay, K. (2017) Human CD8⁺ CD57⁺ T_{EMRA} cells: Too young to be called "old". *PLOS One* Vol. 12, Issue 5.

Virgin, H. W., Wherry, E. J., Ahmed, R. (2009) Redefining Chronic Viral Infection. *Cell* Vol. 138, Issue 1, 30-50.

Wall, N. A., Chue, C. D., Edwards, N. C., Pankhurst, T., Harper, L., Steeds, R. P., Lauder, S., Townend, J. N., Moss, P., Ferro, C. J. (2013) Cytomegalovirus Seropositivity is Associated with Increased Arterial Stiffness in Patients with Chronic Kidney Disease. *PLOS One* Vol. 8, Issue 2.

Wertheimer, A. M., Bennett, M. S., Park, B., Uhrlaub, J. L., Martinez, C., Pulko, V., Currier, N. L., Nikolich-Zugich, D., Kaye, J., Nikolich-Zugich, J. (2014) Aging and Cytomegalovirus Infection Differentially and Jointly Affect Distinct Circulating T Cell Subsets in Humans. *The Journal of Immunology* Vol. 192, Issue 5, 2143-2155.

Weyand, C. M., Brandes, J. C., Schmidt, D., Fulbright, J. W., Goronzy, J. J. (1998) Functional Properties of CD4⁺ CD28⁻ T Cells in the Aging Immune System. *Mechanisms of Aging and Development* Vol. 102, Issue 2-3, 131-147.

Wilkinson, G. W. G., Tomasec, P., Stanton, R. J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., Wang, E. C. Y., Griffin, C. A., Davison, A. J. (2008) Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *Journal of Clinical Virology* Vol. 41, Issue 3, 1k 206-212.

Wills, M. R., Poole, E., Lau, B., Krishna, B., Sinclair, J. H. (2015) The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies? *Cellular & Molecular Immunology* Vol. 12, 1k 128-138.

Winter, J. R., Taylor, G. S., Thomas, O. G., Jackson, C., Lewis, J. E. A., Stagg, H. R. (2019) Predictors of Epstein-Barr virus serostatus in young people in England. *BMC Infectious Diseases* Vol. 19, nr 1007.

Yang, T. O., Chuang, YF., Chiu, YL. (2019) T-cell aging in end-stage renal disease: an evolving story with CMV. *Medical Microbiology and Immunology* Vol. 208, Issue 3-4, 1k 281-287.

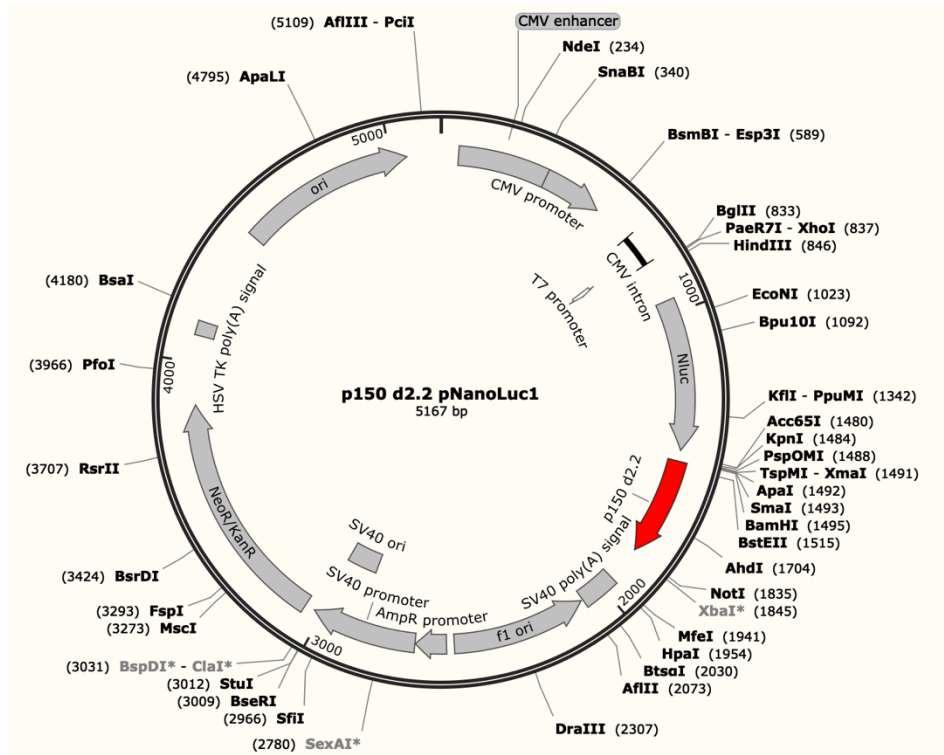
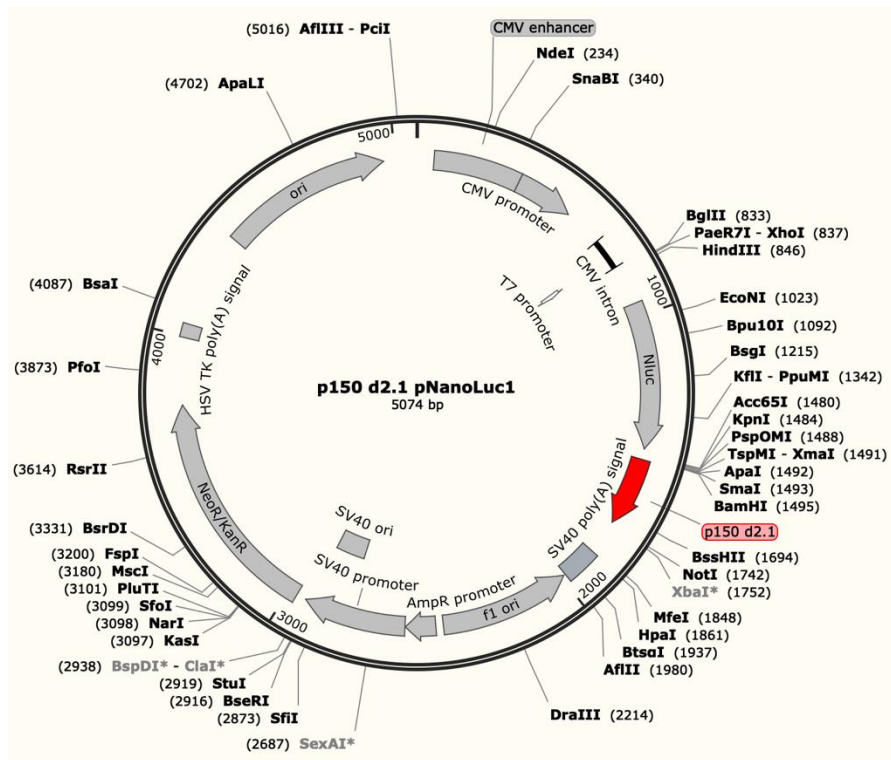
Zubair, A., Burbelo, P. D., Vincent, L. G., Iadarola, M. J., Smith, P. D., Morgan, N. Y. (2011) Microfluidic LIPS for Serum Antibody Detection: Demonstration of a Rapid Test for HSV-2 Infection. *Biomedical Microdevices* Vol. 13, Issue 6, 1k 1053-1062.

LISA 1. Uuritavad haigusrühmad

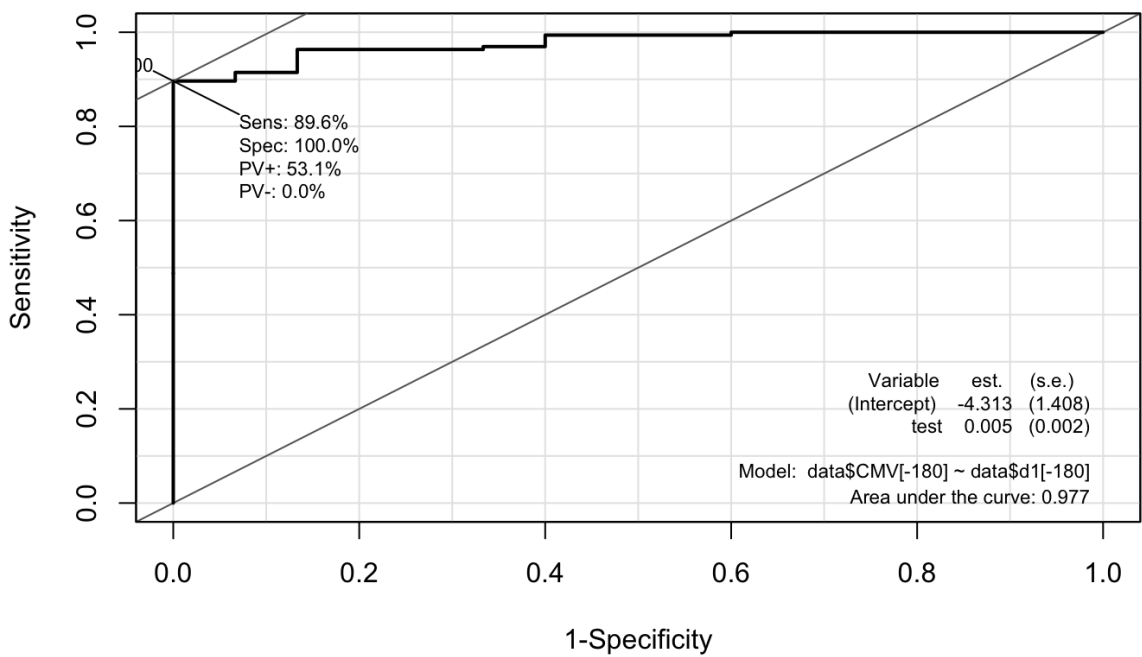
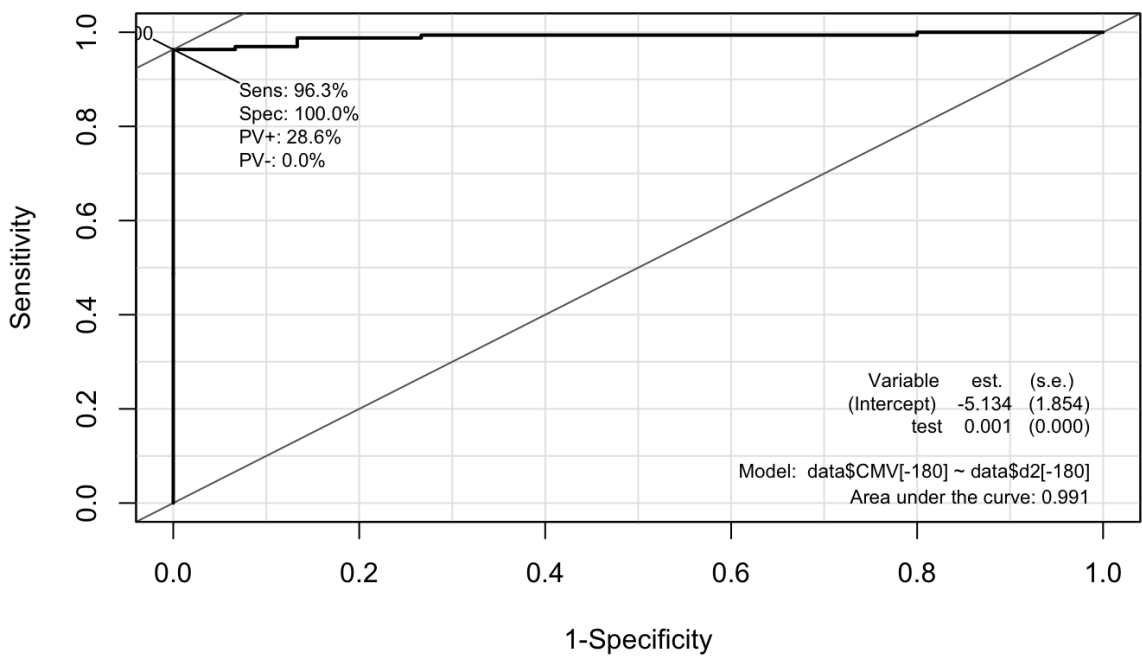
Kood	
A40-41	septitseemia
A49	täpsustamata paikne bakternakkus
C-D48	kasvajad
D50-54	toitumisanemiad
D50-89	toitumisanemiad, vere- ja vereloomeelundite haigused, immuunmehhanismi haaravad haigusmehhanismid
E03-06	kilpnäärme haigusseisundid
E11	teist tüüpi diabeet
E10-11	diabeet
E87	vedelikke, elektrolüütide ja happe-leelise tasakaaluhäired
I10,11,13,15	kõrgvererõhkhaigused
I20-25	südame isheemiatõved
I30-52	muud südamehaigused
I60-68	peaajuveresoonte haigused
I80-82	tromboos ja veenipõletik
I	vereringe- ja hingamiselundite haigused
J09-18	gripp ja kopsupõletik
J45-46	astma ja astmaatilise seisund
K25-31	mao- ja kaksteistsõrmikuhaigused
K80-87	sapipõie, sapiteede ja kõhunäärme haigusseisundid
M05-07	reumatoidartriit ja atropaatia
M05-34	artropaatiad, artroosid, liigese ja sidekoe haigusseisundid
N17-18	neerupuudulikkus
N0-39	neerupuudulikkus ja kuseelundite haigused
N18	krooniline neeruinsufitsients ehk neerupuudulikkus

Allikas: Siseministeeriumi kodulehekülg (RHK-10)

LISA 2. pp150-d2.1 ja pp150-d2.2 plasmiidid



LISA 3. ROC-analüüsi graafikud pp150-d1 ja pp150-d2 jaoks



ABSTRACT

Immune response against cytomegalovirus and its association with inflammatory diseases in old individuals

Aging is a multifaceted process that involves many cellular and molecular mechanisms. As the organism ages, the immune system undergoes multiple deleterious changes, collectively called immunosenescence, that affect both innate and adaptive immunity and result in a drastically weakened immune response of old compared to young individuals. Persistent CMV infection is one of the drivers of immunosenescence through having a large-scale effect on the T cell compartment. The long-term control of CMV infection requires a large amount of immune resources and therefore can severely impair the host immune response. CMV has been associated with age-related diseases but only a few such associations have been well characterized so far. In this work we show that higher anti-CMV antibody titres are associated with several chronic diseases in old individuals. We found that people diagnosed with either type 2 diabetes, chronic kidney disease or disorders of the thyroid gland had significantly higher CMV-specific antibody titres compared to healthy controls. Furthermore, females had higher anti-CMV antibody titres than males and higher antibody levels correlated positively with age. Thus, our results demonstrate that age-related chronic disorders are associated with CMV infection, and confirm the age- and gender-associated differences of CMV-specific antibody titres demonstrated by previous studies. These findings warrant further confirmatory studies in separate disease cohorts but also suggest that anti-CMV antibody levels might serve as a useful biomarker to evaluate immune health status in old individuals.