

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ СИГНАТУР CD8⁺HLA-DR⁺ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ В ПОНИМАНИИ СТАРЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Матвеева К.С., Рыбцов С.А., Шевырев Д.В.

АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус»,
Краснодарский край, Россия

Резюме. Способность популяции CD8⁺HLA-DR⁺Т-лимфоцитов к регуляции иммунного ответа впервые была описана несколько лет назад. Известно, что супрессорные эффекты клеток данной популяции зависят от межклеточного контакта и опосредованы экспрессией молекул-ингибиторов контрольных точек, таких как CTLA-4, TIM-3, PD-1 и LAG-3. Также популяция CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток имеет ряд свойств, объединяющих данную субпопуляцию с конвенциональными CD4⁺ регуляторными Т-лимфоцитами. Тем не менее, характер и функция данной субпопуляции до сих пор остаются слабо изученными. Кроме того, исследование свойств CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток становится актуальным в контексте общих изменений иммунной системы человека, ассоциированных с возрастом, и более высокой чувствительности CD8⁺ Т-лимфоцитов к этим изменениям. Таким образом, целью данной работы стало изучение возрастной динамики и поиск транскрипционных сигнатур субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток. Для этого был проведен цитометрический анализ моноклеарных клеток периферической крови 18 доноров от 21 до 85 лет. Поиск сигнатур был осуществлен при помощи биоинформатического анализа открытых данных РНК секвенирования одиночных клеток. Было обнаружено, что популяция CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток накапливается с возрастом. Транскрипционные сигнатуры данной популяции представляют собой гены, вовлеченные в антигенную презентацию и цитотоксичность, совместно с понижением экспрессии генов транскрипционного комплекса белка-активатора 1. Исходя из этих данных можно предположить механизм супрессорной функции CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-лимфоцитов, ассоциированные со способностью данных клеток презентировать антигены и осуществлять цитотоксическое действие в отношении эффекторных Т-лимфоцитов. Накопление клеток исследуемой популяции может подразумевать потенциальное влияние CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-лимфоцитов на эффективность адаптивных иммунных реакций в процессе старения. Дальнейшие исследования данной популяции могут помочь лучше понять ее роль в возрастных изменениях иммунной системы и разработать стратегии для улучшения иммунного ответа у пожилых людей.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, CD8⁺HLA-DR⁺Treg, старение, транскриптомика, сигнатуры, секвенирование РНК одиночных клеток

Адрес для переписки:

Шевырев Даниил Вадимович
АНОО ВО «Научно-технологический
университет «Сириус»
354340, Россия, Краснодарский край, федеральная
территория «Сириус», Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (923) 134-55-05.
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Address for correspondence:

Daniil V. Shevyrev
1 Olympic Ave
Sirius Federal Territory, Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: +7 (923) 134-55-05.
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Образец цитирования:

К.С. Матвеева, С.А. Рыбцов, Д.В. Шевырев «Исследование
возрастной динамики и транскрипционных сигнатур
CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-лимфоцитов:
перспективы в понимании старения иммунной
системы» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 5. С. 927-932.
doi: 10.15789/1563-0625-IAR-16899

© Матвеева К.С. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.S. Matveeva, S.A. Rybtsov, D.V. Shevyrev "Investigating
age-related dynamics and transcriptional signatures of
CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes: perspectives in
understanding immune system aging", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 927-932.
doi: 10.15789/1563-0625-IAR-16899

© Matveeva K.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IAR-16899

INVESTIGATING AGE-RELATED DYNAMICS AND TRANSCRIPTIONAL SIGNATURES OF CD8⁺HLA-DR⁺ REGULATORY T LYMPHOCYTES: PERSPECTIVES IN UNDERSTANDING IMMUNE SYSTEM AGING

Matveeva K.S., Rybtsov S.A., Shevyrev D.V.

Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. The ability of the CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes population to regulate the immune response was first described several years ago. It is known that the suppressive effects of these cells depend on intercellular interactions and are mediated by the expression of checkpoint inhibitor molecules such as CTLA-4, TIM-3, PD-1 and LAG-3. The CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells also share some properties with conventional CD4⁺ regulatory T lymphocytes. Nevertheless, the characteristics and function of this subpopulation remain poorly understood. Furthermore, studying the properties of CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells becomes relevant in the light of general age-associated changes in the human immune system and the increased sensitivity of CD8⁺T lymphocytes to these changes. Therefore, the aim of this study was to investigate the age dynamics and search for transcriptional signatures of the CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells. For this purpose, flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells from 18 donors aged 21 to 85 years was performed. Bioinformatic analysis of single-cell RNA sequencing data was carried out to search for signatures. It was found that CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells accumulate with age. The transcriptional signatures of this population consist of genes involved in antigen presentation and cytotoxicity, along with a decrease in the expression of genes encoding proteins of activating protein 1 complex. These data suggest mechanisms of suppressor function of CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes associated with the ability of these cells to present antigens and perform cytotoxic activity against effector T lymphocytes. The accumulation of the studied cells may imply a potential influence of CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes on the efficiency of adaptive immune response in the aging. Further studies of this population may provide insights into its role in age-related changes in the immune system and develop strategies to improve the immune response in the elderly.

Keywords: T lymphocytes, CD8⁺HLA-DR⁺Treg, aging, transcriptomics, signatures, single cell RNA seq

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) №23-15-00443.

Введение

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) – это подгруппа Т-лимфоцитов, которая играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа организма. Основная функция регуляторных Т-лимфоцитов заключается в поддержании иммунологической толерантности и предотвращении избыточного иммунного ответа, который может привести к аутоиммунным заболеваниям или воспалительным процессам. Treg способны подавлять активацию других клеток иммунной системы, таких как Т- и В-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки, что помогает предотвращать неадекватные иммунные реакции на собственные ткани организма. Это делается путем выработки специфических цитокинов и молекул, которые подавляют активацию и пролиферацию других клеток иммунной системы [4].

Наиболее изученной является популяция конвенциональных CD4⁺Treg, основными фенотипическими маркерами которой являются CD25 и FoxP3, а также низкая экспрессия CD127. При этом представленность FoxP3 и CD127 обратно коррелируют друг с другом [4]. В 2014 г. в периферической и пуповинной крови человека была идентифицирована новая популяция CD8⁺Treg-клеток, характеризующаяся экспрессией HLA-DR. Супрессорная активность CD8⁺HLA-DR⁺-клеток зависит от межклеточного контакта, опосредованного экспрессией на их поверхности молекул CTLA-4 и PD-1 [1]. Среди этих CD8⁺HLA-DR⁺Treg субпопуляция CD28⁺ демонстрирует более высокую супрессивную способность по сравнению с их аналогами негативными по CD28, а также экспрессирует более высокие уровни молекул, ингибирующих контрольные точки: CTLA-4, TIM-3, PD-1 и LAG-3, нейтрализация которых при помощи антител существенно снижает супрессорный эффект популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg [8]. Было обна-

ружено сходство между CD8⁺HLA-DR⁺Treg и CD4⁺FoxP3⁺Treg в отношении экспрессии TIGIT и хемокиновых рецепторов CCR4 и CCR5. Кроме того, после поликлональной стимуляции TCR CD8⁺HLA-DR⁺Treg увеличивают экспрессию IFN γ и TNF α , что свидетельствует о том, что они не являются истощенными клетками, несмотря на экспрессию PD-1 [3].

В контексте того, что CD8⁺T-лимфоциты, в отличие от CD4⁺T-клеток, более подвержены возраст-ассоциированным изменениям [6], углубленное изучение популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg и их изменений с возрастом не только расширит существующие знания о старении регуляторного звена иммунной системы, но также поможет получить данные, позволяющие прогнозировать глобальные изменения компартмента Treg-клеток в глубокой старости. Таким образом, целью данной работы является изучение возрастной динамики и поиск транскрипционных сигнатур субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺Treg.

Материалы и методы

Объект исследования

Для проведения исследования были взяты 18 условно-здоровых доноров в возрасте от 21 до 85 лет. Образцы крови и сопутствующая информация были получены от доноров после получения от них добровольного информированного согласия, утвержденного локальным этическим комитетом (Протокол заседания Комитета по биоэтике НГУ «Сириус» от 6 марта 2023 года). Забор венозной крови производился из локтевой вены доноров в вакуумные пробирки с натрий-гепарином объемом 10 мл.

Выделение мононуклеарных клеток (МНК). Фракцию МНК выделяли из периферической крови методом дифференциального центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фикола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Кровь ресуспендировали в 1× PBS с добавлением 0,02% ЭДТА в соотношении 1:1, наносили на фикола и центрифугировали при 8 °C, 660 g в течение 30 минут. После центрифугирования интерфазное кольцо, содержащее МНК, переносили в отдельную пробирку и дважды отмывали в 1× PBS + 0,02% ЭДТА центрифугированием 5 минут при 300 g.

Цитометрический анализ. Для подготовки раствора антител брали требуемый объем буфера для окрашивания (1× PBS + 1% FCS) и вносили в него предварительно рассчитанные объемы меченых флуорохромами антител (CD3 PerCP, клон SK7, #345766 (BD Biosciences, USA); CD8 APC, клон RPA-T8, #17-0088-42 (Thermo Fisher Scientific, USA); HLA-DR PE, клон L243, #347401 (BD Biosciences, USA)), сохраняя для конечного объема соотношение 1 × 10⁶ клеток на 100 мл

объема. Смесь клеток и раствора антител и инкубировали 15 минут при комнатной температуре в темноте, затем клетки дважды отмывали буфером для окрашивания и разбавляли до нужного объема.

Биоинформатический анализ. Для определения транскрипционных сигнатур популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg были взяты два открытых набора данных секвенирования одиночных клеток МНК здоровых доноров, каждый из которых содержал по 10 тысяч клеток (10× Genomics). Обработка данных производилась при помощи пакета scanpy [7]. Пайплайн обработки данных представлен на рисунке 1.

После кластеризации МНК с помощью визуализации уровней экспрессии генов в пространстве UMAP был выделен кластер CD8⁺ эффекторных T-лимфоцитов (CD3E high, CD8A high, CCR7 low; рис. 2A), а входящие в него клетки были отобраны для дальнейшего анализа. Для кластеризации на уровне, позволяющем выделить предполагаемый кластер CD8⁺HLA-DR⁺Treg, отобраным клеткам присваивали их исходные значения каунтов генов и повторяли шаги по предобработке данных. Два этапа кластеризации с предобработкой *de novo* позволяют получить более корректное представление целевых клеток в пространстве сниженной размерности и в итоге увеличить разрешение анализа. По результатам второго этапа кластеризации при помощи визуализации уровней экспрессии генов (HLA-DRA high, TIGIT high; рис. 2B), определяли кластер CD8⁺HLA-DR⁺Treg и вычисляли дифференциально экспрессирующиеся гены между данным кластером и остальными кластерами при помощи критерия Манна–Уитни (рис. 2B).

Обработка данных. Статистическая обработка и визуализация данных производилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 10.1.2 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Для проверки гипотезы о нормальном распределении выборки использовался критерий Шапиро–Уилка. Данные анализировались с доверительным интервалом 95%, а значение *p* менее 0,05 считалось показателем значимости. Обработка и визуализация данных проточной цитометрии осуществлялась в программном обеспечении FlowJo™ v. 10.10 (BD Life Sciences, USA).

Результаты и обсуждение

Популяция CD8⁺HLA-DR⁺Treg была выделена в ходе цитометрического анализа образцов МНК доноров в возрасте от 21 до 85 лет. Стратегия гейтирования представлена на рисунке 3A. Последующий статистический анализ этих данных показал, что популяция CD8⁺HLA-DR⁺Treg

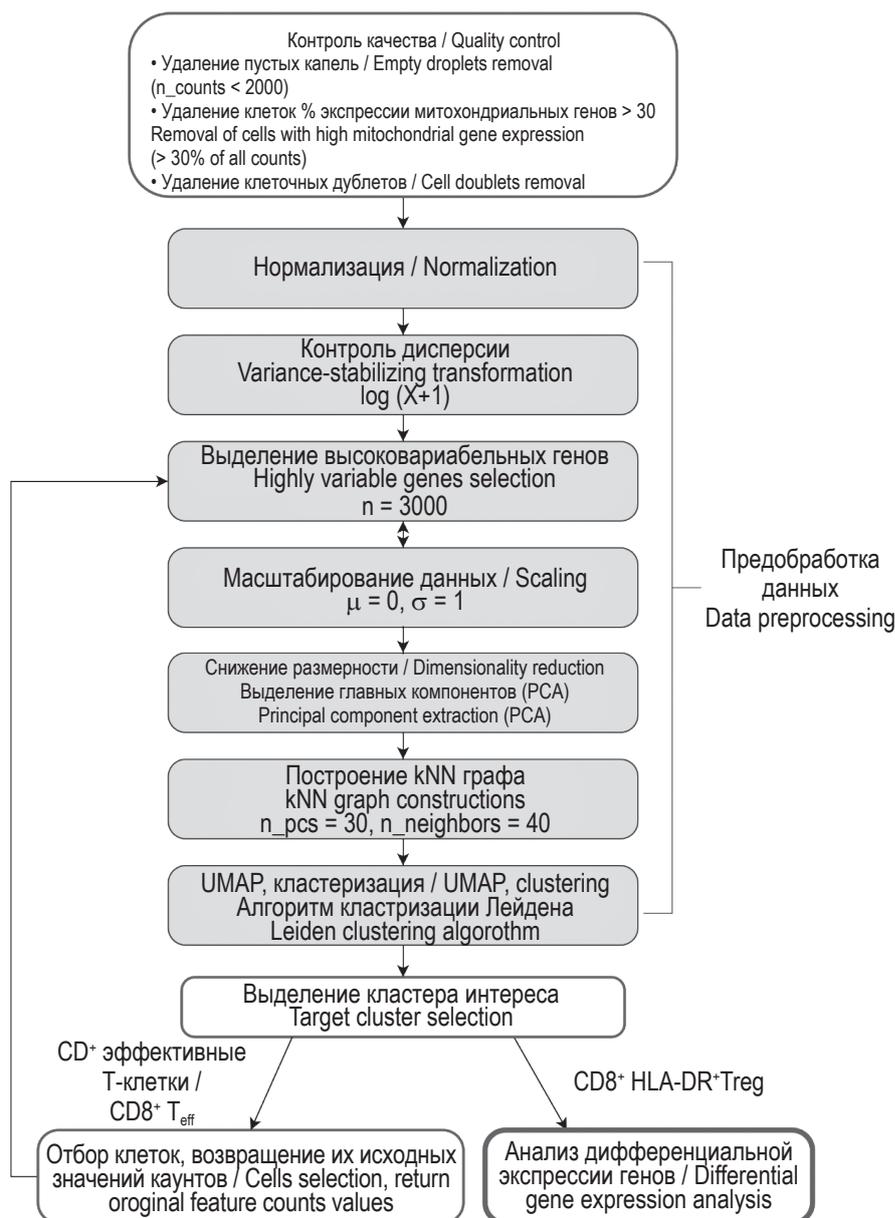


Рисунок 1. Блок-схема стратегии биоинформатического анализа со значениями примененных параметров

Figure 1. Flowchart of the bioinformatics analysis pipeline with values of the applied parameters

накапливается с возрастом (рис. 2Б), что говорит о вовлеченности данной субпопуляции в возраст-ассоциированные изменения иммунной системы. Предполагается, что вместе с характерным для пожилых людей повышением частоты CD4⁺Treg-клеток, накопление CD8⁺HLA-DR⁺Treg может способствовать снижению эффективности адаптивных иммунных реакций в процессе старения [5].

Для более детального описания субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺Treg и поиска молекул, способных прояснить механизм функционирования этих клеток, был проведен биоинформатический

анализ открытых данных РНК секвенирования одиночных клеток (рис. 2). Среди генов с повышенной экспрессией присутствуют группы генов, вовлеченные в презентацию антигенов через молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, CD74) и реализующие цитотоксичность (GZMA, GZMK, GZMM, NKG7). Также было обнаружено, что в данной субпопуляции снижена экспрессия генов JUN, JUNB и FOS, являющихся субъединицами комплекса белка-активатора 1 (AP-1). Данный транскрипционный фактор регулирует множество процессов,

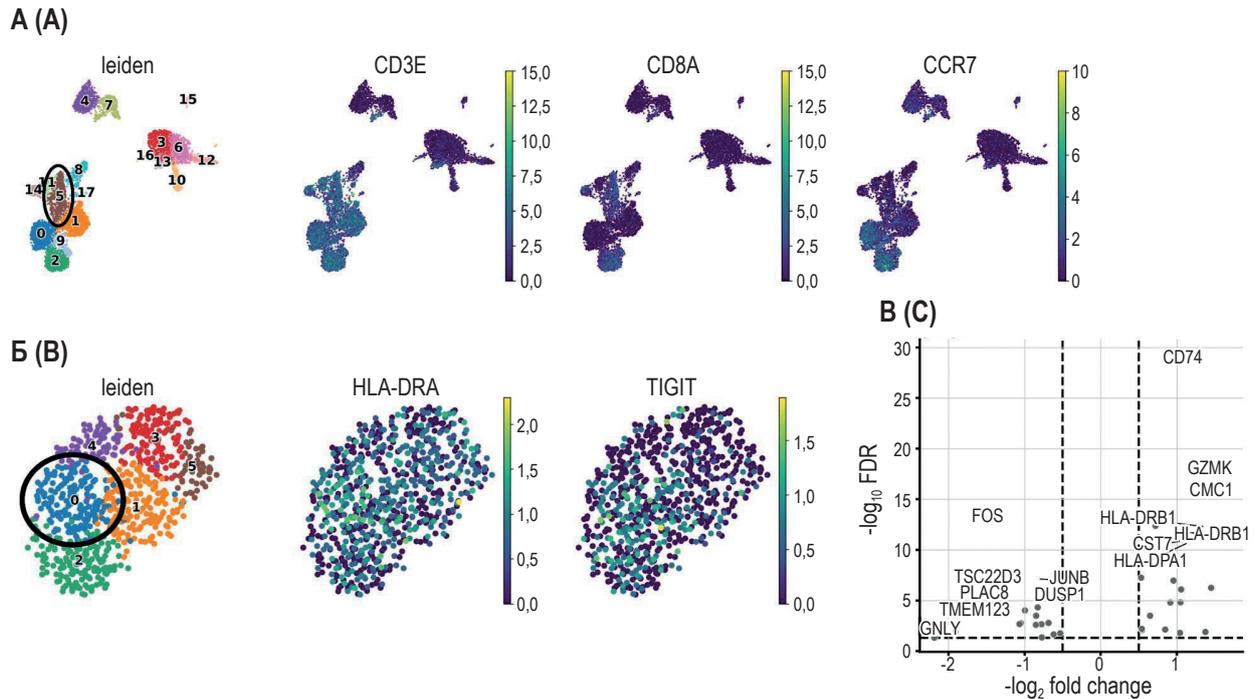


Рисунок 2. Биоинформатический анализ данных РНК секвенирования одиночных клеток

Примечание. А – визуализация кластеризации МНК в представлении UMAP. Кластер под номером 5 (обведен) характеризуется высокой экспрессией генов CD3E, CD8A и низкой экспрессией CCR7, что описывает его как кластер эффекторных CD8⁺T-лимфоцитов. Б – визуализация кластеризации эффекторных CD8⁺T-лимфоцитов в представлении UMAP. Кластер под номером 0 (обведен) характеризуется повышенной экспрессией HLA-DRA и TIGIT и соответствует кластеру CD8⁺HLA-DR⁺Treg. В – гены, дифференциально экспрессированные в кластере CD8⁺HLA-DR⁺Treg. Названия генов соответствуют 7 генам с повышенной экспрессией ($\log_2FC > 0,5$) и 7 генам с пониженной экспрессией ($\log_2FC < 0,5$).

Figure 2. Bioinformatics analysis of single-cell RNA sequencing data

Note. A, visualization of PBMCs clustering in UMAP embedding. Cluster number 5 (encircled) is characterized by high expression of genes CD3E, CD8A and low expression of CCR7, describing it as a cluster of CD8⁺ effector T lymphocytes. B, visualization of CD8⁺ effector T lymphocyte clustering in UMAP embedding. Cluster number 0 (encircled) is characterized by increased expression of HLA-DRA and TIGIT, corresponding to the CD8⁺HLA-DR⁺Treg cluster. C, differentially expressed genes in the CD8⁺HLA-DR⁺Treg cluster. Gene names correspond to 7 genes with increased expression ($\log_2FC > 0.5$) and 7 genes with decreased expression ($\log_2FC < 0.5$).

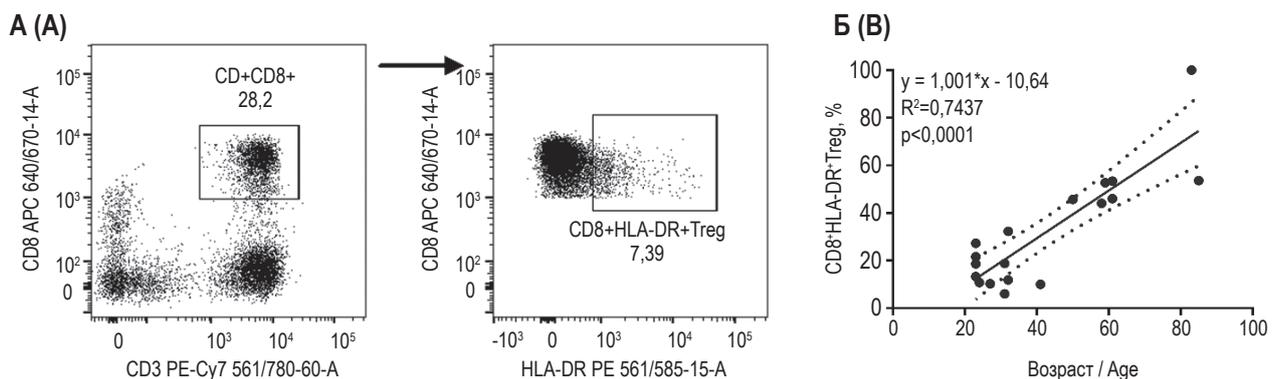


Рисунок 3. Результаты цитометрического анализа субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺Treg

Примечание. А – стратегия гейтирования, использованная при цитометрическом анализе. Популяция CD3⁺CD8⁺ гейтирована из живых одиночных клеток. Б – линейная регрессионная модель, описывающая увеличение процентного содержания субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺Treg с возрастом.

Figure 3. Results of flow cytometry analysis of the CD8⁺HLA-DR⁺Treg subpopulation

Note. A, gating strategy used in flow cytometry analysis. CD3⁺CD8⁺ population was gated from live single cells. B, linear regression model describing the increase in percentage content of the CD8⁺HLA-DR⁺Treg subpopulation with age.

связанных с пролиферацией и активацией клеток. Эффекты AP-1 также играют важную роль в дифференцировке и функционировании в случае Т-лимфоцитов, в том числе Treg. Например, дефицит JunB приводит к снижению супрессивной способности CD4⁺Treg [2]. Исходя из полученных данных можно предположить, что субпопуляция CD8⁺HLA-DR⁺Treg может регулировать CD4⁺ эффекторные Т-лимфоциты за счет способности к антигенной презентации и последующей цитотоксичности в отношении эффекторных Т-лимфоцитов. Вероятно, данная субпопуляция при этом обладает более низкой супрессорной активностью, чем CD4⁺Treg, однако с возрастом способность CD8⁺HLA-DR⁺Treg к регуляции иммунного ответа может приобретать более значимую роль.

Заключение

Таким образом, в данной работе была более детально изучена субпопуляция CD8⁺HLA-DR⁺Treg. Обнаружено, что доля данной популяции в периферической крови линейно увеличивается с возрастом. На уровне транскриптома были найдены гены, потенциально связанные с супрессивной способностью этой популяции, а также сигнатуры, ассоциированные с истощением клеток. Накопление CD8⁺HLA-DR⁺Treg с возрастом позволяет предположить, что данная популяция может быть вовлечены в патологические процессы, ассоциированные с возрастными изменениями. Поэтому важно подтвердить полученные данные экспериментально путем оценки супрессивной и пролиферативной активности популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg.

Список литературы / References

1. Arruvito L., Payaslián F., Baz P., Podhorzer A., Billordo A., Pandolfi J., Semeniuk G., Arribalzaga E., Fainboim L. Identification and Clinical Relevance of Naturally Occurring Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 9, pp. 4469-4476.
2. Katagiri T., Kameda H., Nakano H., Yamazaki S. Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB. *Immunol. Med.*, 2021, Vol. 44, no. 3, pp. 197-203.
3. Machicote A., Belén S., Baz P., Billordo L.A., Fainboim L. Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4⁺Foxp3⁺ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2788. doi: 10.3389/fimmu.2018.02788.
4. Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 3100. doi: 10.3389/fimmu.2019.03100.
5. Simone R., Zicca A., Saverino D. The frequency of regulatory CD3⁺CD8⁺CD28⁻CD25⁺ T lymphocytes in human peripheral blood increases with age. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 84, no. 6, pp. 1454-1461.
6. Whiting C.C., Siebert J., Newman A.M., Du H., Alizadeh A.A., Goronzy J., Weyand C.M., Krishnan E., Fathman C.G., Maecker H.T. Large-Scale and Comprehensive Immune Profiling and Functional Analysis of Normal Human Aging. *PLOS One*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0133627. doi: 10.1371/journal.pone.0133627.
7. Wolf F.A., Angerer P., Theis F.J. SCANPY: Large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 15. doi: 10.1186/s13059-017-1382-0.
8. Yani S.L., Keller M., Melzer F.L., Weinberger B., Pangrazzi L., Sopper S., Trieb K., Lobina M., Orrù V., Fiorillo E., Cucca F., Grubeck-Loebenstein B. CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells Change With Aging: They Increase in Number, but Lose Checkpoint Inhibitory Molecules and Suppressive Function. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1201. doi: 10.3389/fimmu.2018.01201.

Авторы:

Матвеева К.С. – студент магистратуры направления «Иммунология и биомедицина» АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Рыбцов С.А. – к.б.н., руководитель ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Шевырев Д.В. – к.м.н., научный сотрудник ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Authors:

Matveeva K.S., Master's Student of Immunobiology and Biomedicine Department, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Rybtsov S.A., PhD (Biology), Head, Cell Technology and Immunology Resource Center, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Shevyrev D.V., PhD (Medicine), Research Associate, Cell Technology and Immunology Resource Center, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 09.04.2024

Принята к печати 24.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 09.04.2024

Accepted 24.04.2024