

AIM2 Dampens the Homeostasis of Murine Inhibitory CD8+Ly49+ Regulatory T cells

ping Yi¹, Jiao Jiang², Ming Yang², Haijing Wu², and Qianjin Lu³

¹The Second Xiangya Hospital of Central South University

²Second Xiangya Hospital Department of Dermatology

³Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College

September 28, 2023

Abstract

Regulatory T (Treg) cells play a crucial role in immune tolerance, and numerous studies have focused on the molecular mechanisms of CD4+ Treg cells, whereas the role and relevant mechanisms of CD8+ Treg cells remain unclear. Ly49 is located at murine NK and T cells, and plays a similar role to human KIRs in regulation of immune response. In this paper, we have explored the effect of AIM2 deficiency on the homeostasis of CD8+Ly49+ regulatory T (Treg) cells in AIM2 knockout (KO) mouse model. We have performed KLH immunization model for AIM2 KO mice and found enhanced function of suppressive CD8+ Treg cells in the absence of AIM2, indicating AIM2 dampens the homeostasis of murine inhibitory CD8+ Treg cells.

AIM2 Dampens the Homeostasis of Murine Inhibitory CD8+Ly49+ Regulatory T cells

Ping Yi^{1,2+}, Jiao Jiang^{1,3+}, Ming Yang¹⁺, Haijing Wu^{1*}, Qianjin Lu^{1,3*}

¹Department of Dermatology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Key Laboratory of Medical Epigenomics, Changsha, Hunan, China

²Department of Radiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, China

³Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Nanjing, Jiangsu, China

* Corresponding author at:

Department of Dermatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Key Laboratory of Medical Epigenomics, Changsha, Hunan, China

Email:*chriswu1010@126.com*(Haijing Wu)

Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Nanjing, Jiangsu, China

Email:*qianlu5860@pumcderm.cams.cn*(Qianjin Lu)

+ These authors contributed equally to this work and share first authorship.

Abstract:Regulatory T (Treg) cells play a crucial role in immune tolerance, and numerous studies have focused on the molecular mechanisms of CD4+ Treg cells, whereas the role and relevant mechanisms of CD8+ Treg cells remain unclear. Ly49 is located at murine NK and T cells, and plays a similar role to human

KIRs in regulation of immune response. In this paper, we have explored the effect of AIM2 deficiency on the homeostasis of CD8⁺Ly49⁺ regulatory T (Treg) cells in AIM2 knockout (KO) mouse model. We have performed KLH immunization model for AIM2 KO mice and found enhanced function of suppressive CD8⁺ Treg cells in the absence of AIM2, indicating AIM2 dampens the homeostasis of murine inhibitory CD8⁺Treg cells.

Keywords:CD8⁺T, Ly49, AIM2, Autoimmune disease, Regulatory T cell

Autoimmune diseases are characterized with the failure of immune tolerance, and regulatory T (Treg) cells are required for immune tolerance, such as FOXP3⁺CD4⁺ and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)⁺FOXP3⁻CD8⁺Treg cells. Intensive studies have focused on the molecular mechanisms of CD4⁺ Treg cells, whereas the function and relevant mechanisms of CD8⁺Ly49⁺ Treg cells remain investigated. CD8⁺Ly49⁺ Treg cells are considered to have immuno surveillance and immunosuppressive effects during the process of thymic negative selection. They are able to blunt autoimmunity without compromising systemic immunity[1]. However, the specific origin of these CD8⁺Ly49⁺Treg cells and how they take part in the natural progression of autoimmunity remain poorly defined. To date, the best demonstrated role of CD8⁺ Treg cells is to inhibit GC reaction. The enhanced GC reaction and autoantibody production exist in many animal models with defective CD8⁺ Treg cells[2]. Besides, the CD8⁺Ly49⁺ Treg cells have reported in various settings, such as colitis, hepatitis, arthritis, diabetes, viral infection, tumor, atherogenesis and organ transplantation[2]. Ly49 plays a similar role to human killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) in regulating immune response via MHC-Ia, but varies in structures. Ly49 family consists of inhibitory subsets including Ly49A, B, C, E, F, G, I, J, Q and activating subsets like Ly49D, H[3]. It could regulate immuno surveillance of NK cells and cytotoxic T cells (CTLs) against tumor, infection and autoimmunity[4]. Further, even though there are some evidence about the existence of human CD8⁺ Treg subset, they remain to be firmly established because the Ly49 is a mouse-specific gene cluster without human homologs at sequence level[2].

Absent in Melanoma 2 (AIM2) serves as a cytoplasmic sensor of double-stranded DNA (dsDNA) and participates in the assembly of inflammasome[5]. It plays vital roles in innate and adaptive immune responses with inflammasome-dependent/independent manners in diverse autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus[6], psoriasis[7], rheumatoid arthritis[8], primary Sjogren's syndrome[9], ankylosing spondylitis[10], and cancers[11-13]. Our group previously demonstrated that AIM2 has played an inflammasome-independent role in the differentiation of lupus B cells via regulating Blimp1 and Bcl6[6]. The expression of AIM2 in classic CD4⁺FOXP3⁺ Treg cells was elevated to suppress autoimmunity and favoring the function of Treg cells through attenuating Akt/mTOR pathway and affecting immune metabolism, and its expression could be induced by TGF-β[14].

Βεσιδες, τρανσφριπτιον φαστορς Αιολος (ζοδεδ βψ *Iκζφ3*) ανδ Ηελιος (ζοδεδ βψ *Iκζφ2*) βελονγινγ το της ΙΚΑΡΟΣ φαμιλψ, παρτικιπατε ιν της ρεγυλατιον οφ λψμπηοιδ λινεαγε ζομμιτμεντ ανδ μαιντενανζε οφ λψμπηο-ψψτε ημεοστασιε. Ιν ημαν ΦΟΞΠ3⁺ Τρεγ ζελλς, της ιντεραξιον οφ Αιολος ανδ ΦΟΞΠ3 σιλενζεδ της εξπρεσσιον οφ IL-2 το ινδυζε της διφφερεντιατιον οφ φυνκτιοναλ Τρεγ ζελλς[15]. Ηελιος ις μαινλψ εξπρεσσεδ ιν Τ-ζελλς πρεξυρσορς ανδ Τρεγ ζελλς, ανδ μαινταινς της συπρεσσιε αξτιτψ οφ “Δ4⁺ΦΟΞΠ3⁺ ανδ “Δ8⁺Δ44⁺Δ122⁺Λψ49⁺Τρεγ ζελλς[16], ωηιςη δαμπενς οεραξιατεδ ιμμυνε ρεσπονσες το αλλειατε τισσυε δαμαγε ιν αυτοιμμυνε δισεασες. Ας ρεπορτεδ πρειουσλψ, ρεδυζεδ εξπρεσσιον λεελ οφ Ηελιος ανδ Αιολος ζοντριβυτεδ το της δεφιξιενψ οφ “Δ8⁺ Τρεγ ζελλς ιν μουσε μοδελ λαχι οφ $Tγφβρ2$, ανδ Εομες ρεχυιρεδ φορ ημεοστασιε οφ μυριν “Δ8⁺ΦΟΞΠ3⁺ Τρεγ ζελλς[17]. Ηοωερ, το της βεστ οφ ουρ κνοωλεδγε, της ρολες οφ AIM2, Ηελιος ανδ Αιολος ιν μυριν “Δ8⁺Λψ49⁺ Τρεγ ζελλς ρεμαιν ελυσιε.

Κεψηολε Λιμπετ Ηεμοςψανιν (ΚΛΗ), α λαργε προτειν μολευλε ωιτη ηγη ιμμυνογενιςτψ, ινδυζες ιμμυνε αξτιατιον. Ιν της στυδψ, ωε ζαρριεδ ουτ ΚΛΗ ιμμυνιζατιον ιν AIM2 κνοξκουτ (KO) ανδ “57ΒΛ/6Θ αιλδ τψπε (ΩT) μιςε το εξπλορε της φρεχυενψ οφ “Δ8⁺ Τρεγ ζελλς. Της φλω ζηαρτ οφ μυριν εξπεριμεντ ωας σηοων ιν **Φιγυρε 1A**. Ιτ ηας βεεν ρεεαλεδ τηρατ ζομπαρεδ ωιτη ΩT μιςε, της γενε εξπρεσσιον οφ ρεγυλατορψ “Δ8⁺ Τ ζελλ μαρκερ-“Δ122 ανδ ινηβιτορψ Λψ49 ρεςεπτορς, ινζλυδινγ Λψ49B, “ ανδ I, ωας ελεατεδ ιν σπλενις “Δ8⁺ Τ ζελλς οφ AIM2 KO μιςε ον της 10^{+7} δαψ οφ ΚΛΗ ιμμυνιζατιον (**Φιγυρε 1B**), ωηερεας της γενε εξπρεσσιον

οφ ακτιατινγ Λψ49 ρεζεπτορς ζονταινινγ Λψ49Δ ανδ Λψ49Η ωας σταβλε (**Φιγυρε 1**). Τηεσε αλτερατιονς ινδιατεδ τηε ιμμυνοσυπρεσσιε στατε οφ ΚΛΗ-ιμμυνιζεδ AIM2 KO μιε. Νοταβλψ, τηε εξπρεσσιον λεελς οφ Ηελιος ανδ Αιολος ωερε σλιγητλψ ελεατεδ ιν “Δ8+ T ζελλς οφ σπλενοςψτες (**Φιγυρε 1Δ**), ρεεαλινγ τηατ τηεψ μιγητ προμοτε Λψ49 εξπρεσσιον ιν μυρινε “Δ8+ T ζελλς οφ σπλενοςψτες.

Βεσιδες, ας PNA-σεχ ρεπορτεδ, σπλενις “Δ8+ T ζελλς οφ ΚΛΗ-ιμμυνιζεδ AIM2 KO μιε (n = 3) φεατυρε αιτη υπρεγυλατεδ εξπρεσσιον οφ KIP-ρελατεδ ιμμυνοσυπρεσσιε γενες ζομπαφεδ αιτη ΩΤ μιε (n = 3) (**Φιγυρε 2A**). Τηεσε σρεεενεδ KIP-ρελατεδ διφφερεντιαλ εξπρεσσεδ γενες ωερε ζορρελατεδ το ακτιατιον οφ ιννατε ανδ αδαπτιε ιμμυνε ρεσπονσε, αηιτη ωας ζονφιρμεδ βψ ενριεημεντ αναλψτις οφ πατημαψ (**Φιγυρε 2B**). Σπλενις “Δ8+ T ζελλς οφ ανοτηερ γρουπ οφ ΚΛΗ-ιμμυνιζεδ AIM2 KO ανδ ΩΤ μιε (KO/ΩΤ, n = 5) ωερε αππλιεδ το αλιδατε τηε ρεσυλτς οφ PNA-σεχ, ανδ ζονσιστεντ αιτη τηε φινδινγς οφ τρανσριπτομε σεχυενζινγ. Ακτιατινγ κιλλερ ζελλ λεστιν-λικε ρεζεπτορ (Κλρ)-ι1 ιν μυρινε “Δ8+ T ζελλς ωας ρεμαφαβλψ δοωνρεγυλατεδ, ιν ζοντραστ, ινηιβιτορψ ρεζεπτορς, συζη ας Κλρα2, ωερε σιγνιφιζαντλψ υπρεγυλατεδ (**Φιγυρε 2F**), δεμονστρατινγ τηε δεφιςιενψ οφ AIM2 προμοτες τηε εξπρεσσιον οφ ιμμυνοσυπρεσσιε ρεζεπτορς ιν μυρινε “Δ8+ T ζελλς. Τηε πριμερς φορ χυαντιτατιε ρεερσε τρανσριπτον ΠΓΡ (χPT-ΠΓΡ) ωερε λιστεδ ινΣυππλεμενταλ **Ταβλε 1**. Ινδεεδ, τηε σαμπλε σιζε οφ AIM2 KO μιε σηρουλδ βε ενλαργεδ το φυρτηερ δεμονστρατε τηις ζονζλυσιον ιν μουσε μοδελες.

Το συμ υπ, AIM2 δαμπενς τηε ηομεοστασιε οφ μυρινε ινηιβιτορψ “Δ8+ Τρεγ ζελλς, ανδ φυρτηερ ρεσεαρχη ον σπειριψ μολεσυλε μεσημανισμ οφ ρεγυλατιον ρεμαινς ονγοινγ.

Ετηις Απροαλ Στατεμεντ

Προτοζολς οφ ανιμαλ εξπεριμεντς ωερε ινσπεετεδ ανδ αππροεδ βψ τηε Ανιμαλ όφε ανδ Υσε δημιττεε οφ τηε Λαβιορατορψ Ανιμαλ Ρεσεαρχη θντερ, τηε Σεζονδ Ξιανγψα Ηοσπιταλ οφ θντραλ Σουτη Υνιερσιτψ (No. 2022722).

Δατα Ααιλαβιλιτψ Στατεμεντ

Αλλ τηε δατα συππορτινγ τηις παπερ ωερε πρεσεντ αιτηιν τηε παπερ. Τηε οριγιναλ δατα αρε αλσο ααιλαβλε ον ρεχυεστ το τηε ζορρεσπονδινγ αυτηορς.

Αυτηορ δητριβυτιονς

Χιανθιν Λυ ανδ Ηαιθινγ Ζη θεσιγνεδ τηε στυδψ, συπερισεδ τηε ρεσεαρχη ανδ ρεισεδ τηε μανυσριπτ, Πινγ Ψι, Θιαο Θιανγ ανδ Μινγ Ψανγ ωροτε τηε μανυσριπτ ανδ περφορμεδ αλλ εξπεριμεντ.

Φυνδινγ Στατεμεντ

Τηις ωορκ ωας συππορτεδ βψ ήηανγ Θιανγ Σζηολαρς Προγραμ (No. X2021122), Ηυναν Ταλεντ Ψουνγ Ινεστιγατορ (No. 2019ΡΣ2012), Ηυναν Ουτστανδινγ Ψουνγ Ινεστιγατορ (No. 2020Θ2055), ΑΜΣ Ιννοατιον Φυνδ φορ Μεδιιαλ Σζιενζες (“ΙΦΜΣ”) (No.2021-I2M-1-059, No. 2019-I2M-5-033), τηε Νον-προφιτ θντραλ Ρεσεαρχη Ινστιτυτε Φυνδ οφ ήηιεσε Αζαδεμψ οφ Μεδιιαλ Σζιενζες (2020-P”320-003).

δηνφλιιτ οφ Ιντερεστ

Τηε αυτηορς ρεπορτ νο ζονφλιιτς οφ ιντερεστ.

Αζκνοωλεδγμεντς

Ωε τηανκ αλλ τηε ζολλεαγυες ιν ουρ λαβιορατοριες φορ τηε ηελπψυλ ζοοπερατιον ανδ μεανινγψυλ συγγεστιονς οφ τηις προθεετ.

Ρεφερενζε

[1] Σ. Τσαι, Ζ. Ζεμεντε-άσαφες, Π. Σανταμαρια, “Δ8(+) Τρεγς ιν αυτοιμμυνιτψ: λεαρνινγ ‘σελφ’-ζοντρολ φρομ εξπεριενζε, θηλ Μολ Λιφε Σζι 68(23) (2011) 3781-95.

[2] Σ. Μισηρα, Σ. Σρινιασαν, “. Μα, Ν. Ζηανγ, “Δ8(+) Ρεγυλατορψ Τ θηλ - A Μψτερψ το Βε Ρεεαλεδ, Φροντ Ιμμυνολ 12 (2021) 708874.

- [3] A.P. Σεργενκελ, Λ.“. Κινγρψ, P.A. Σλαψδεν, Της λψ49 γενε φαμιλψ. Α βριεφ γυιδε το της νομενδλατυρε, γενετικε, ανδ ρολε ιν ιντραζελλυλαρ ινφεστιον, Φροντ Ιμμυνολ 4 (2013) 90.
- [4] “. Ίαντ, A. Φενις, Γ. ήιςαννε, B. Παψραστρε, Σ. Υγολινι, E. ίερ, ΣΗΠ-1-μεδιατεδ ιηψιτορψ σιγναλς προμοτε ρεσπονσιενεσ ανδ αντι-τυμουρ φυντιον οφ νατυραλ κιλλερ ψελλες, Νατ δψμυν 5 (2014) 5108.
- [5] H. Ζηη, M. Ζηηο, “. ήανγ, “. ήαν, X. Λυ, H. Ωυ, Της ζομπλεξ ρολε οφ AIM2 ιν αυτοιμμυνε δισεασες ανδ ζανζερες, Ιμμυν Ινφλαμμ Δις 9(3) (2021) 649-665.
- [6] M. Ψανγ, Δ. Λονγ, Λ. Ηυ, Z. Ζηηο, X. Λι, Ψ. Γυο, Z. Ηε, M. Ζηηο, Λ. Λυ, Φ. Λι, H. Λονγ, H. Ωυ, X. Λυ, AIM2 δεψιενψ ιν B ψελλες αμελιοφατες σψστεμις λυπις ερψτηματοσυς βψ ρεγυλατινγ Βλψπ-1-Βζλ-6 αξισ-μεδιατεδ B-ψελλ διψφερεντιατιον, Σιγναλ Τρανσδυτ Ταργετ Τηερ 6(1) (2021) 341.
- [7] Δ. έρμα, Σ.Z. Φεχρι, Γ. Σιγυρδαρδοττιφ, “. Βικ Εδινγ, “. Σανδιν, “. Ενερψäck, Enhanced Inflammasome Activity in Patients with Psoriasis Promotes Systemic Inflammation, J Invest Dermatol 141(3) (2021) 586-595.e5.
- [8] Y. Chen, Q. Fujuan, E. Chen, B. Yu, F. Zuo, Y. Yuan, X. Zhao, C. Xiao, Expression of AIM2 in Rheumatoid Arthritis and Its Role on Fibroblast-Like Synoviocytes, Mediators Inflamm 2020 (2020) 1693730.
- [9] A.G. Vakrakou, I.P. Svolaki, K. Evangelou, V.G. Gorgoulis, M.N. Manoussakis, Cell-autonomous epithelial activation of AIM2 (absent in melanoma-2) inflammasome by cytoplasmic DNA accumulations in primary Sjögren's syndrome, J Autoimmun 108 (2020) 102381.
- [10] G. Guggino, D. Mauro, A. Rizzo, R. Alessandro, S. Raimondo, A.S. Bergot, M.A. Rahman, J.J. Ellis, S. Milling, R. Lories, D. Elewaut, M.A. Brown, R. Thomas, F. Ciccia, Inflammasome Activation in Ankylosing Spondylitis Is Associated With Gut Dysbiosis, Arthritis Rheumatol 73(7) (2021) 1189-1199.
- [11] M. Zhang, C. Jin, Y. Yang, K. Wang, Y. Zhou, R. Wang, T. Li, R. Hu, AIM2 promotes non-small-cell lung cancer cell growth through inflammasome-dependent pathway, J Cell Physiol 234(11) (2019) 20161-20173.
- [12] J.E. Wilson, A.S. Petrucelli, L. Chen, A.A. Koblansky, A.D. Truax, Y. Oyama, A.B. Rogers, W.J. Brickey, Y. Wang, M. Schneider, M. Mühlbauer, W.C. Chou, B.R. Barker, C. Jobin, N.L. Allbritton, D.A. Ramsden, B.K. Davis, J.P. Ting, Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt, Nat Med 21(8) (2015) 906-13.
- [13] R.E. Dawson, V. Deswaerte, A.C. West, K. Tang, A.J. West, J.J. Balic, L.J. Gearing, M.I. Saad, L. Yu, Y. Wu, P.S. Bhathal, B. Kumar, J.T. Chakrabarti, Y. Zavros, H. Oshima, D.M. Klinman, M. Oshima, P. Tan, B.J. Jenkins, STAT3-mediated upregulation of the AIM2 DNA sensor links innate immunity with cell migration to promote epithelial tumorigenesis, Gut (2021).
- [14] W.C. Chou, Z. Guo, H. Guo, L. Chen, G. Zhang, K. Liang, L. Xie, X. Tan, S.A. Gibson, E. Rampanelli, Y. Wang, S.A. Montgomery, W.J. Brickey, M. Deng, L. Freeman, S. Zhang, M.A. Su, X. Chen, Y.Y. Wan, J.P. Ting, AIM2 in regulatory T cells restrains autoimmune diseases, Nature 591(7849) (2021) 300-305.
- [15] R. Gandhi, D. Kumar, E.J. Burns, M. Nadeau, B. Dake, A. Laroni, D. Kozoriz, H.L. Weiner, F.J. Quintana, Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells, Nat Immunol 11(9) (2010) 846-53.
- [16] H.J. Kim, R.A. Barnitz, T. Kreslavsky, F.D. Brown, H. Moffett, M.E. Lemieux, Y. Kaygusuz, T. Meissner, T.A. Holderried, S. Chan, P. Kastner, W.N. Haining, H. Cantor, Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios, Science 350(6258) (2015) 334-9.
- [17] S. Mishra, W. Liao, Y. Liu, M. Yang, C. Ma, H. Wu, M. Zhao, X. Zhang, Y. Qiu, Q. Lu, N. Zhang, TGF-β and Eomes control the homeostasis of CD8+ regulatory T cells, J Exp Med 218(1) (2021).



