

DISS. ETH NO. 29776

**Proteomic and functional genetic landscapes underlying
T cell biology in ageing, autoimmunity & cancer**

Thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES
(DR. sc. EZTH Zurich)

presented by

Ian Alexander Vogel
MSc. McGill University
born on 15.01.1987

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jacob Corn (supervisor)
Prof. Dr. Roger Geiger (co-examiner)
Prof. Dr. Federica Sallusto (co-examiner)

2023

1. Summary

Tightly regulated immune responses are required to recognize and eliminate pathogenic threats while mitigating collateral damage to host-tissues. In mammals, CD4⁺ and CD8⁺ T cells play a pivotal role in orchestrating and executing these functions, respectively. Maintaining effective T cell programs over the lifespan of an individual is therefore essential for protection against disease. Using a combination of mass-spectrometry based proteomics and functional genetic screens, we investigated the mechanisms governing effective T cell responses in the contexts of ageing, auto-immunity, and cancer.

Using a pulsed SILAC approach, we interrogated the dynamics of protein turnover in naïve and memory T cell subsets, from which distinct compartment-specific translational signatures could be identified. We found basal protein turnover rates increased from naïve to memory cell states, which correlated with elevated responsiveness to activation stimuli but diminished viability. Profiling T cell subsets from aged human donors (> 79 years old) revealed that global protein synthesis and degradation rates decline with ageing. We confirmed that murine T cells from aged mice fail to restore protein turnover rates following adoptive transfer into young mice, suggesting age-induced 'proteomic imprinting' is maintained cell-intrinsically. These findings provide new biological insights into the cellular processes that determine T cell functionality in the context of ageing.

Our assessment of translational dynamics further revealed high turnover rates of transcription factors (TFs) among all T cell subsets, which we hypothesized is important for maintaining cellular identity. We focused on FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells (Tregs) due to their molecular symmetry and plasticity with respect to conventional CD4⁺ T cells, despite serving opposing physiologic functions to maintain peripheral tolerance and suppress pro-inflammatory, autoimmune disease. To determine the functional contribution of TFs most potent in promoting Treg identity, we developed an approach to perform pooled CRISPRa screens in primary human CD4⁺ T cells to probe for regulators of IL2RA expression, the hallmark surface marker of human Tregs and an important mechanism by which Tregs exert their suppressive function. Mesenchyme homeobox 1 (MEOX1) was among the top-ranked positive regulators of IL2RA and was also uniquely expressed and rapidly renewed, specifically in human Tregs. Validation and further characterization via ectopic expression of a MEOX1 cDNA ORF revealed proteomic remodeling associated with canonical Treg signature genes. MEOX1 over-expression (OE) conferred Tregs with enhanced suppressive functional capacity *in vitro*. Our results demonstrate MEOX1 promotes a Treg-like phenotype, which may be important for maintaining immune tolerance and tissue homeostasis in humans and could potentially be further explored to engineer more stable Tregs for ACTs to treat autoimmune disease.

Finally, we performed genome-wide CRISPRa screens in cancer cells to comprehensively profile resistance and sensitivity factors to cognate CAR-T cell pressure. We selected cancer cells of diverse etiology, including mantle cell lymphoma (MCL), hepatocellular carcinoma (HCC) and malignant glioblastoma

(GBM), to apply cognate CAR-T cell pressure (anti-CD19, anti-GPC3 and anti-IL13Ra2, respectively). In total, our screens identified 264 genes influencing cancer cell fitness under CAR-T cell pressure, including several factors common among cancer types. Strikingly, RNF19B was a top-ranked resistance factor in all three screens, previously undescribed for its role in cancer. Its resistance phenotype was linked to an increased abundance of calcium/calmodulin-dependent kinase kinase (CAMKK2), which we confirmed as a promising therapeutic target in combination with CAR-T cells via its inhibition *in vitro* and *in vivo* using the selective inhibitor, STO-609. A further analysis of our screen results indicated that proliferation drivers, among which the most enriched pathway included genes involved in PI3K signaling, paradoxically sensitized cancer cells to CAR-T cell pressure. We confirmed that growth factors (GFs) triggering several RTKs known to initiate PI3K signaling decreased cancer cell fitness specifically under cognate CAR-T cell pressure. In ongoing efforts, we are further developing this approach by engineering CAR-T cells to express and secrete RTK ligands upon engagement with cognate antigen to induce PI3K signaling in cancer cells within immediate proximity, thus rendering them hyper-sensitive to immune attack.

In summary, these investigations describe fundamental processes governing T cell biology with therapeutic implications for age-related disease, auto-immunity, and cancer.

Résumé

Des réponses immunitaires étroitement régulées sont nécessaires pour reconnaître et éliminer les menaces pathogènes tout en atténuant les dommages collatéraux causés aux tissus de l'hôte. Chez les mammifères, les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ jouent un rôle central dans l'orchestration et l'exécution de ces fonctions, respectivement. Le maintien de programmes efficaces de cellules T tout au long de la vie d'un individu est donc essentiel pour la protection contre la maladie. En utilisant une combinaison de protéomique basée sur la spectrométrie de masse et de cribles génétiques fonctionnels, nous avons étudié les mécanismes régissant les réponses efficaces des cellules T dans les contextes du vieillissement, de l'auto-immunité et du cancer.

En utilisant une approche SILAC pulsée, nous avons interrogé la dynamique du renouvellement des protéines dans les sous-ensembles de cellules T naïves et mémoires, à partir desquelles des signatures traductionnelles distinctes et spécifiques aux compartiments ont pu être identifiées. Nous avons constaté que les taux de renouvellement des protéines de base augmentaient de l'état des cellules naïves à celui des cellules mémoires, ce qui est en corrélation avec une réactivité élevée aux stimuli d'activation mais une viabilité diminuée. Le profilage de sous-ensembles de cellules T provenant de donneurs humains âgés (> 79 ans) a révélé que les taux globaux de synthèse et de dégradation des protéines diminuent avec le vieillissement. Nous avons confirmé que les cellules T murines provenant de souris âgées ne parviennent pas à restaurer les taux de renouvellement des protéines après un transfert adoptif chez des souris jeunes, ce qui suggère que l'"empreinte protéomique" induite par l'âge est maintenue de manière intrinsèque aux cellules. Ces résultats fournissent de nouvelles informations biologiques sur les processus cellulaires qui déterminent la fonctionnalité des cellules T dans le contexte du vieillissement.

Notre évaluation de la dynamique traductionnelle a en outre révélé des taux élevés de renouvellement des facteurs de transcription (TF) dans tous les sous-ensembles de cellules T, ce qui, selon notre hypothèse, est important pour le maintien de l'identité cellulaire. Nous nous sommes concentrés sur les cellules T régulatrices FOXP3⁺CD4⁺ (Tregs) en raison de leur symétrie moléculaire et de leur plasticité par rapport aux cellules T CD4⁺ conventionnelles, bien qu'elles remplissent des fonctions physiologiques opposées de maintien de la tolérance périphérique et de suppression des maladies pro-inflammatoires et auto-immunes. Pour déterminer la contribution fonctionnelle des TF les plus puissants dans la promotion de l'identité des Treg, nous avons développé une approche pour effectuer des cribles CRISPRa groupés dans les cellules T CD4⁺ humaines primaires afin de rechercher les régulateurs de l'expression de l'IL2RA, le marqueur de surface caractéristique des Tregs humains et un mécanisme important par lequel les Tregs exercent leur fonction suppressive. Mesenchyme homeobox 1 (MEOX1) figurait parmi les régulateurs positifs les mieux classés de l'IL2RA et était également exprimé de manière unique et rapidement renouvelé, spécifiquement dans les Tregs humains. La validation et la caractérisation plus poussée via l'expression ectopique d'un ORF d'ADNc MEOX1 ont révélé un remodelage protéomique associé aux gènes signatures canoniques des Tregs. La surexpression de MEOX1 a conféré aux Tregs une capacité fonctionnelle suppressive accrue *in vitro*. Nos résultats démontrent un rôle de MEOX1 dans la promotion d'un

phénotype de type Treg, qui peut être important pour le maintien de la tolérance immunitaire et de l'homéostasie tissulaire chez l'homme et qui pourrait potentiellement être exploré plus avant pour créer des Tregs plus stables pour les ACTs afin de traiter les maladies auto-immunes.

Enfin, nous avons effectué des criblages CRISPRa à l'échelle du génome dans des cellules cancéreuses afin d'établir un profil complet des facteurs de résistance et de sensibilité à la pression exercée par les cellules CAR-T cognées. Nous avons sélectionné des cellules cancéreuses d'étiologies diverses, y compris le lymphome à cellules du manteau (MCL), le carcinome hépatocellulaire (HCC) et le glioblastome malin (GBM), pour appliquer la pression des cellules CAR-T apparentées (anti-CD19, anti-GPC3 et anti-IL13Ra2, respectivement). Au total, nos cribles ont permis d'identifier 264 gènes influençant l'adaptation des cellules cancéreuses à la pression exercée par les cellules CAR-T, dont plusieurs facteurs communs aux différents types de cancer. Il est frappant de constater que RNF19B, dont le rôle dans le cancer n'avait pas été décrit auparavant, était un facteur de résistance classé en tête de liste dans les trois cribles. Son phénotype de résistance pourrait être lié à une abondance accrue de la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CAMKK2), que nous avons confirmée comme une cible thérapeutique prometteuse en combinaison avec les cellules CAR-T via son inhibition *in vitro* et *in vivo* à l'aide de l'inhibiteur sélectif STO-609. Une analyse plus poussée des résultats de notre criblage a indiqué que les facteurs de prolifération, parmi lesquels la voie la plus enrichie comprenait des gènes impliqués dans la signalisation PI3K, sensibilisaient paradoxalement les cellules cancéreuses à la pression des cellules CAR-T. Nous avons confirmé que les facteurs de croissance (GF) déclenchant plusieurs RTK connus pour initier la signalisation PI3K diminuaient la capacité des cellules cancéreuses spécifiquement sous la pression des cellules CAR-T cognées. Dans le cadre de nos efforts actuels, nous développons cette approche en concevant des cellules CAR-T qui expriment et sécrètent des ligands RTK lors de l'engagement avec l'antigène connu afin d'induire une signalisation PI3K dans les cellules cancéreuses à proximité immédiate, les rendant ainsi hyper-sensibles à l'attaque immunitaire.

En résumé, ces recherches décrivent les processus fondamentaux qui régissent la biologie des cellules T et ont des implications thérapeutiques pour les maladies liées à l'âge, l'auto-immunité et le cancer.