

Natalia Ochocka-Lewicka

## **“Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing”**

Supervisor: Prof. Bożena Kamińska-Kaczmarek

### **Summary**

Malignant gliomas are highly lethal tumors of the central nervous system (CNS). The most common glioblastomas (GBM) are considered to be immunologically inert (“cold”) tumors, characterized by a highly immunosuppressive microenvironment and low potential for activation of the inflammatory and anti-tumor responses. Glioma-associated macrophages (GAMs) are myeloid cells accumulating in GBMs that comprise the major population of immune cells infiltrating gliomas. Multiple studies demonstrated that GAMs instigate tumor-induced immunosuppression, promote invasion, and support tumor growth.

Although the roles of GAMs in tumor progression have been widely investigated, the substantial heterogeneity of this population impeded its precise functional characterization. GAMs may originate from two cell lineages: specialized macrophages of the brain – microglia, and macrophages derived from the circulating monocytes that arrive at the tumor from the periphery – monocyte-derived macrophages (MDMs). Recent reports indicated that these two cell types can have different functions in glioma development, although studies on the specific roles were limited due to the lack of discriminating markers. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) allows addressing the issue of cell heterogeneity, as it provides transcriptomic analysis of every single-cell in a mixture of thousands of different cells. Thus, information about diverse subpopulations is retained, in contrast to bulk methods where the gene expression is averaged over a total number of cells, and the information about the cell diversity is lost.

In this study, the myeloid (CD11b<sup>+</sup>) compartment of the glioma microenvironment was investigated with the scRNA-seq and Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by sequencing (CITE-seq). CITE-seq combines the scRNA-seq with a simultaneous protein profiling. Based on the single-cell expression profiles, novel markers for the separation of microglia and MDMs were identified and validated (*Tmem119* and *Gal-3*). Microglia and MDMs upregulated similar transcriptional networks in the glioma microenvironment. However, the response of MDMs was more pronounced. MDMs showed three monocyte-to-macrophage differentiation stages. The monocytic signature was associated with the highest expression of interferon-response genes, whereas differentiated macrophages upregulated factors involved in supporting tumor growth (e.g. *Trem2*, *ApoE*, *Cd9*, *Arg1* genes) and immunosuppression (PD-L1 protein, *IL18bp* and *Il1rn* genes). Additionally, this study demonstrated for the first time the sex-dependent differences in induction of MHCII complex and interferon-response genes in microglia and MDMs upon glioma-induced activation. An elevated level of MHCII in males and more pronounced upregulation of the interferon-response genes in females may constitute sex-dependent differences in incidence and outcomes of malignant gliomas found in humans.

Natalia Ochocka-Lewicka

## “Deciphering the diversity of glioma-infiltrating myeloid cells with single-cell RNA and protein sequencing”

Promotor: prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

### Streszczenie

Glejaki złośliwe są guzami ośrodkowego układu nerwowego (OUN) powodującymi bardzo wysoką śmiertelność. Pomimo dużej liczby komórek układu odpornościowego gromadzących się w guzie, glejaki wykazują szereg mechanizmów tłumienia odpowiedzi przeciwnowotworowej i są powszechnie uznawane za immunologicznie „zimne” guzy. Makrofagi naciekające glejaki (*ang. Glioma Associated Macrophages - GAMs*) są komórkami mieloidalnymi, które stanowią najliczniejszą populację komórek odpornościowych gromadzących się w tych guzach. Wyniki wielu badań pokazały, że komórki te zamiast inicjować odpowiedź przeciwnowotworową, wspierają inwazyjność oraz uczestniczą w immunosupresji indukowanej przez guz przyczyniając się do wzrostu guza..

GAMs stanowią różnorodną populację komórkową, na którą składają się mikroglej oraz naciekające monocyty i makrofagi, co znacząco utrudnia funkcjonalną charakterystykę tych komórek. Mikroglej to wyspecjalizowane, rezydentne komórki mieloidalne zasiedlające mózg we wczesnej fazie rozwoju embrionalnego. Natomiast, makrofagi różnicują z monocytów (*ang. Monocyte-Derived Macrophages, MDMs*), napływających do guza z obwodu, a warunkach homeostazy występują w OUN w śladowej liczbie. Ostatnie badania wykazały, że te dwie populacje mogą pełnić odmienne funkcje w procesie wzrostu guza.

Sekwencjonowanie transkryptomu pojedynczej komórki (*ang. single-cell RNA sequencing – scRNA-seq*) pozwala dogłębnie zbadać różnorodność komórek w populacji GAMs, gdyż umożliwia analizę transkryptomu każdej pojedynczej komórki w mieszaninie tysięcy różnych komórek. Dzięki temu, informacja na temat poszczególnych subpopulacji zostaje zachowana, w przeciwieństwie do standardowych metod RNA-seq, w których profil ekspresji różnych komórek jest uśredniany, a informacja na temat różnic pomiędzy podgrupami komórek zostaje stracona.

W niniejszej pracy, komórki mieloidalne naciekające doświadczalne mysie glejaki zostały scharakteryzowane przy użyciu metody scRNA-seq. Dodatkowo, wykorzystana została metoda łącząca scRNA-seq z jednoczesnym oznaczeniem panelu białek powierzchniowych (*ang. Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by sequencing – CITE-seq*). Dzięki uzyskanym profilom ekspresji pojedynczych komórek, zidentyfikowane zostały nowe markery komórkowe (Tmem119 i Gal-3) pozwalające rozdzielić populację mikrogleju oraz pochodzące ze szpiku populacje MDMs. Wykazano, że mikroglej i MDMs aktywują ekspresję podobnych grup funkcjonalnych genów w mikrośrodku glejaka, jednakże w MDMs ekspresja indukowanych genów była silniejsza. Wśród populacji MDMs wykryto obecność subpopulacji

o różnym stopniu zróżnicowania: monocyty, stadium przejściowe pomiędzy monocytami i makrofagami oraz zróżnicowane makrofagi. Monocyty charakteryzowały się najwyższą ekspresją genów odpowiedzi na interferon (co sugeruje funkcje zapalne i przeciwnowotworowe), natomiast zróżnicowane makrofagi wykazały podwyższoną ekspresję czynników biorących udział we wspieraniu nowotworzenia (np. geny *Trem2*, *ApoE*, *Cd9*, *Arg1*) oraz immunosupresji (białko PD-L1 i geny *IL18bp*, *Il1rn*). Dodatkowo, wyniki niniejszej pracy po raz pierwszy wykazały zależne od płci różnice w poziomie kompleksu MHCII oraz ekspresji genów indukowanych przez interferon podczas aktywacji komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku guza. Komórki męskie miały wyższy poziom kompleksu MHCII, natomiast komórki żeńskie wykazały zwiększoną ekspresję genów odpowiedzi na interferon. Stwierdzone różnice (potwierdzone także na materiale od pacjentów z glejakami) mogą mieć wpływ na obserwowane różnice w częstości występowania glejaków oraz w odpowiedzi na terapię pacjentów różnej płci.