

**Julian Swatler**

## **Role of leukemic extracellular vesicles in differentiation and suppressive activity of regulatory T cells**

### **ABSTRACT**

Chronic and acute myeloid leukemia (CML/AML) constitute cancers that arise in the bone marrow, due to malignant transformation (by oncogenic mutations such as *BCR-ABL1*, *FLT3-ITD* and others) of myeloid progenitor cells. As myeloid leukemias develop, they expand outside the bone marrow and engraft other tissues, such as the spleen or blood. Development and expansion of myeloid leukemias has been recently shown to be significantly facilitated by immunosuppression - a state when anti-tumor immunity is attenuated and dysfunctional. Immunosuppression is largely established by suppressive cell subsets of the immune system, such as regulatory T cells (Tregs) - a type of T cells that express transcription factor Foxp3 and perform tolerogenic/suppressive function. Tregs have been shown to be upregulated in blood and bone marrow of patients with myeloid leukemias. However, as this has only recently been described, mechanisms that drive expansion and suppressive activity of Tregs in leukemias remain largely unexplored. This thesis has aimed at dissecting modulation of Tregs by leukemic extracellular vesicles (EVs) - small, lipid bilayer-enclosed structures released outside cells as mediators of intercellular communication. As EVs have been demonstrated to modulate non-immune components of the leukemic bone marrow niche and have been shown to interact with Tregs in solid tumors, they might also constitute drivers of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in myeloid leukemias.

Using *ex vivo* cultures of murine and human Tregs with EVs released by CML and AML cell lines, leukemic EVs were shown to upregulate suppressive phenotype and activity of Tregs, as well as level of Foxp3. Leukemic EVs also induced Foxp3 expression in non-regulatory, conventional T cells. Leukemic EVs have upregulated phosphorylation of STAT5 and downregulated mTOR-S6 signaling in T cells to promote Treg induction, activity and stability. RNA-sequencing has revealed significant remodeling of Treg transcriptome by leukemic EVs, upregulated expression of tumor Treg genes and several transcription factors engaged in this regulation. Furthermore, 23-color spectral flow cytometry and unsupervised clustering tools have revealed 2 subsets of human effector Tregs (eTreg) expanded by leukemic EVs - CD30<sup>+</sup>CCR8<sup>hi</sup>TNFR2<sup>hi</sup> eTreg1 and CD39<sup>+</sup>TIGIT<sup>hi</sup> eTreg2. Mass spectrometric analysis of leukemic EVs' proteome revealed presence of TNF superfamily protein 4-1BBL, which was engaged in modulation of expression of effector molecules (CD30, TNFR2, LAG-3) on Tregs. Finally, in a developed immunocompetent mouse model of CML-like disease, influence of EVs on Tregs and leukemic progression was validated by development of leukemia by Rab27a-deficient cells, with attenuated secretion of EVs.

Rab27a-deficient leukemia has exhibited reduced engraftment in animals, whereas Tregs were less abundant and exhibited a less activated, less suppressive phenotype than in wild-type counterparts.

Altogether, data presented in this thesis pin-point extracellular vesicles, released by chronic and acute myeloid leukemia cells, as significant modulators of regulatory T cells - their induction, suppressive phenotype, function and effector subsets. *In vivo*, in a mouse model of leukemia-like disease, Rab27a-mediated secretion of EVs was shown to modulate Tregs and leukemic engraftment. Therefore, EVs and EVs-Tregs interaction may be evaluated as potential therapeutic targets in myeloid neoplasms.

## STRESZCZENIE

Przewlekła i ostra białaczka szpikowa są nowotworami powstającymi w szpiku kostnym w wyniku transformacji nowotworowej (mutacji onkogennych takich jak *BCR-ABL1*, *FLT3-ITD* i innych) komórek progenitorowych linii mieloidalnej. Wraz z rozwojem choroby, komórki białaczkowe ulegają ekspansji poza szpik kostny, do innych tkanek, takich jak śledziona czy krew. Ostatnie badania wykazały, że rozwój białaczek szpikowych jest wspierany przez immunosupresję - stan, w którym przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna jest zaburzona. Immunosupresja jest w dużej mierze modulowana przez supresyjne komórki układu odpornościowego, w tym regulatorowe limfocyty T (Tregs) - populację limfocytów T, która charakteryzuje się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Foxp3 i pełni tolerogenną/supresyjną funkcję. Ilość Tregs jest podwyższona we krwi i szpiku kostnym pacjentów chorujących na białaczki szpikowe. Obserwacja ta została dokonana stosunkowo niedawno i stąd wciąż słabo poznane są czynniki, które powodują wzrost ilości i aktywności Tregs w białaczkach szpikowych. Celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było określenie, jaką rolę w modulacji Tregs odgrywają białaczkowe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) - małe struktury, otoczone dwuwarstwową błoną lipidową, wydzielane na zewnątrz komórek i pełniące rolę w komunikacji międzykomórkowej. Wcześniejsze badania pokazały, że białaczkowe EVs mogą wpływać na komórki niszy szpiku kostnego, a EVs z nowotworów litych mogą wpływać na biologię regulatorowych limfocytów T. Stąd w poniższej rozprawie postawiono hipotezę, że białaczkowe EVs również mogą kontrolować regulatorowe limfocyty T.

W hodowlach *ex vivo* mysich i ludzkich regulatorowych limfocytów T z białaczkowymi pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi pokazano, że białaczkowe EVs wzmacniają fenotyp i aktywność supresyjną Treg oraz poziom czynnika Foxp3. Białaczkowe EVs doprowadziły też do indukcji Foxp3 w nieregulatorowych, konwencjonalnych limfocytach T. Białaczkowe EVs doprowadziły do wzrostu fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT5 oraz zahamowania szlaku mTOR-S6 w limfocytach T, promując w ten sposób indukcję, aktywność i stabilność Tregs. Sekwencjonowanie RNA wykazało znaczące zmiany w transkryptomie Treg, podwyższoną ekspresję genów specyficznych dla Tregs w nowotworach oraz wskazało szereg czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w regulację Tregs przez białaczkowe EVs. Za pomocą 23-parametrycznej spektralnej cytometrii przepływowej oraz analizy bioinformatycznej danych cytometrycznych, zidentyfikowano dwie subpopulacje ludzkich efektorowych Tregs (eTreg), które ulegały ekspansji pod wpływem białaczkowych EVs - CD30+CCR8<sup>hi</sup>TNFR2<sup>hi</sup> eTreg1 oraz CD39+TIGIT<sup>hi</sup> eTreg2. Za pomocą spektrometrii masowej przeanalizowano skład białkowy białaczkowych EVs i zidentyfikowano w nich białko 4-1BBL (z rodziny TNF). 4-1BBL, znajdujące się w białaczkowych EVs, odpowiadało za wzrost cząsteczek efektorowych CD30, TNFR2 i LAG-3 na Tregs. W ostatniej części, z wykorzystaniem mysiego modelu przewlekłej białaczki szpikowej zbadano wpływ EVs na Tregs i progresję choroby, poprzez porównanie rozwoju białaczki wywołanej przez komórki typu dzikiego

oraz przez komórki pozbawione białka Rab27a, która wydzielają mniejszą ilość białaczkowych EVs. Brak ekspresji Rab27a przez komórki białaczkowe doprowadził do niższego nacieku komórek białaczkowych w myszach, a regulatorowe limfocyty T wyizolowane z tych zwierząt wykazywały mniej aktywowany i mniej supresyjny fenotyp, niż w przypadku białaczki wywołanej przez komórki typu dzikiego (niezmienione).

Podsumowując, wyniki przedstawione w poniższej rozprawie wykazały, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, wydzielane przez komórki przewlekłej i ostrej białaczki szpikowej, stanowią istotny czynnik modulujący regulatorowe limfocyty T - doprowadzając do indukcji Tregs, wzrostu fenotypu i aktywności supresyjnej oraz ekspansji silnie efektorowych subpopulacji. W mysim modelu przewlekłej białaczki szpikowej, regulowane przez Rab27a wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki białaczkowe również wpływało na regulatorowe limfocyty T oraz rozwój choroby. Tym samym, białaczkowe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i ich interakcja z regulatorowymi limfocytami T mogą stanowić potencjalny cel terapeutyczny w białaczkach szpikowych.