

DISS. ETH NO. 29750

Cellular architecture shapes the naïve T cell response

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Benjamin David Hale

born on 03.07.1995

MSc Biology, ETH Zurich

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Berend Snijder

Prof. Dr. Annette Oxenius

Prof. Dr. Nicola Zamboni

2023

Abstract

T cells comprise an essential branch of the adaptive immune system. They possess the ability to recognize foreign antigens presented on the surface of infected cells as well as cancer cells, and subsequently initiate responses to eradicate these dangerous cellular entities. T cells which have yet to encounter foreign antigen, termed naïve T cells, proliferate, and differentiate following antigen-induced activation. This serves to produce a large population of effector T cells, which acquire cytotoxic traits enabling them to kill target cells, followed by the generation of memory T cells that provide long-term immunity to the pathogen in question. The diversification of antigen-specific naïve T cells into effector and memory T cells during an immune response is highly reproducible at the level of the whole T cell population. However, underlying this reproducibility are individual naïve T cells whose fates and functional outcomes vastly differ from one another.

The fate of an individual naïve T cell has been almost exclusively attributed to various extrinsic factors occurring throughout an immune response, such as the strength of the external antigen signal and the availability of specific cytokines. However, a small number of studies have provided evidence to suggest that T cell fate may also be influenced by pre-existing cellular heterogeneity within naïve T cell populations. The phenotypic dimensions that differ between naïve T cells and their consequences on T cell fate represent largely unanswered questions in T cell biology, and accordingly, we do not yet have an effective way to predict the eventual fate of a naïve T cell following its antigenic stimulation. Therefore, an enhanced understanding of the cellular mechanisms that contribute to heterogeneous T cell antigen responses would provide huge benefits to our understanding of T cell functions across a wide range of different immune responses.

Single-cell transcriptomics and flow cytometry represent two of the most common techniques used to analyze cellular heterogeneity amongst immune cells. These methods provide insights into the amount of protein and RNA within cells, but do not tell us about how cells are spatially

organized. Indeed, the cellular morphology and subcellular spatial organization of a cell, which we term cellular architecture, represents a layer of huge phenotypic and functional diversity both between and within immune cell types.

Therefore, the aim of this thesis has been to systematically characterize the architectural states of primary T cells, and to investigate a potential role of cellular architecture in predetermining the short-term and long-term responses of individual naïve T cells to antigen.

In **chapter 1**, we introduce the functions of T cells in the immune system, and discuss the cell-intrinsic and cell-extrinsic factors currently known to influence T cell diversification following antigenic stimulation.

In **chapter 2**, we discuss the importance of cellular morphology in the immune system, emphasizing how dynamic morphological changes in response to environmental cues, in addition to the specific morphological state of a cell at a given time, are fundamental in the coordination of a fully functional immune response. We will also introduce the methodologies available to systematically investigate morphological heterogeneity. In particular, this will focus on how high-content imaging has been employed in a number of recent publications from our lab, exemplifying both the extent and the functional relevance of morphology in cancer cells and cells of the healthy immune system. This chapter finishes with a spotlight on our recent publication, where we developed a tool to profile T cell activation via their morphology, which has subsequently been employed in a number of publications.

In **chapter 3**, we present the majority of data generated throughout this thesis, under the title '**cellular architecture shapes the naïve T cell response**'. Through the combination of high-throughput fluorescence microscopy and deep learning, we report that the heterogeneity in the subcellular architectures of naïve CD8 T cells at the time of activation predetermines, or indeed *shapes*, their short-term and long-term responses to antigen. This architectural heterogeneity, defined by the presence (T_{\emptyset} , pronounced as 'stripy') or absence (T_{\circ} , pronounced as 'conventional') of deep nuclear envelope invaginations, is dynamically coordinated throughout T cell development, activation and differentiation. Upon T cell antigenic stimulation, T_{\emptyset} architectures become morphologically polarized and display stronger T cell receptor (TCR) signaling in a mechanism dependent upon heightened calcium influx. Subsequently, T_{\emptyset} architectures predominantly proliferate into larger TCF1⁻ effector-like colonies, whilst T_{\circ} architectures preferentially differentiate into TCF1⁺ memory precursors. Taken together, the data presented in this thesis reveals that cellular architecture is an intrinsic predeterminant of the early TCR sig-

naling response and subsequent cell fate decisions of individual naïve T cells.

Finally, in **chapter 4**, we will discuss the impact of our findings in T cell biology and beyond. Additional preliminary data and experiments outlining our future plans in this research field will be discussed in detail. In particular, these will focus on improving current technological limitations, as well as extending our findings into more complex physiologically relevant contexts.

Taken together, the data presented in this thesis uncover a fundamental role of cellular architecture in influencing the functional responses of T cells to antigen. We hope that this knowledge can be harnessed to further investigate, predict and manipulate T cell function across the fields of viral immunology, vaccinations and immune responses against cancer.

Zusammenfassung

T Zellen bilden einen wesentlichen Teil des adaptiven Immunsystems. Sie können fremde Antigene erkennen, die an der Oberfläche von infizierten Zellen sowie Krebszellen präsentiert werden, und im Anschluss Reaktionen initiieren, um diese potentiell gefährlichen Zellen zu eliminieren. Noch nicht aktivierte T Zellen, sogenannte naive T Zellen, proliferieren und differenzieren nach Antigen-induzierter Aktivierung. Dadurch entsteht eine große Population von Effektor-T Zellen, die zytotoxische Eigenschaften erwerben, um Zielzellen zu töten, gefolgt von der Bildung von Gedächtnis-T Zellen, die eine langfristige Immunität gegen den betreffenden Erreger bieten. Die Differenzierung von antigenspezifischen naiven T Zellen in Effektor- und Gedächtnis-T Zellen während einer Immunantwort ist auf der Ebene der gesamten T Zell-Population hochreproduzierbar. Dieser Reproduzierbarkeit liegen jedoch individuelle naive T Zellen zugrunde, deren Schicksale und funktionelle Ergebnisse stark voneinander abweichen.

Das Schicksal einer individuellen naiven T Zelle wurde fast ausschließlich verschiedene zell-extrinsischen Faktoren während einer Immunantwort zugeschrieben, wie zum Beispiel die Stärke des externen Antigensignals und der Verfügbarkeit spezifischer Zytokine. Einige wenige Studien legen jedoch nahe, dass das Schicksal von T Zellen auch durch die bereits vorhandene zelluläre Heterogenität innerhalb von Populationen naiver T Zellen beeinflusst werden kann. Die phänotypischen Unterschiede zwischen naiven T Zellen und ihre Auswirkungen auf das Schicksal von T Zellen sind in der T Zell-Biologie weitgehend unbeantwortete Fragen. Demzufolge haben wir noch keine effektive Methode, um das endgültige Schicksal einer naiven T Zelle nach ihrer antigenen Stimulation vorherzusagen. Ein besseres Verständnis der zellulären Mechanismen, die zu heterogenen T Zell-Antigen-Reaktionen beitragen, würde unser Verständnis der T Zell-Funktionen über ein breites Spektrum von Immunreaktionen erheblich verbessern.

Einzelzell-Transkriptomik und Durchflusszytometrie sind zwei der gängigsten Methoden zur Analyse zellulärer Heterogenität bei Immunzellen. Diese Methoden bieten Einblicke in die Menge an Protein und RNA in Zellen, geben jedoch keine Auskunft darüber, wie Zellen räumlich

organisiert sind. Die zelluläre Morphologie und die subzelluläre räumliche Organisation, die wir als zelluläre Architektur bezeichnen, repräsentiert eine beträchtliche phänotypische und funktionale Diversität. Diese Variabilität existiert sowohl zwischen als auch innerhalb von Immunzelltypen und kann mit Hilfe von Mikroskopie untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die architektonischen Zustände primärer T Zellen systematisch zu charakterisieren und eine potenzielle Rolle der zellulären Architektur bei der Vorherbestimmung der kurz- und langfristigen Reaktionen einzelner naiver T Zellen auf Antigene zu untersuchen.

Im **Kapitel 1** stellen wir die Funktionen von T Zellen im Immunsystem vor und diskutieren die zellintrinsic und zellextrinsic Faktoren, von denen derzeit bekannt ist, dass sie die Diversifizierung von T Zellen nach antigenischer Stimulation beeinflussen.

Im **Kapitel 2** diskutieren wir die Bedeutung der zellulären Morphologie im Immunsystem und betonen, wie dynamische morphologische Veränderungen als Reaktion auf Umweltsignale sowie der spezifische morphologische Zustand einer Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt für die Koordination einer voll funktionsfähigen Immunantwort fundamental sind. Wir werden auch die Methoden vorstellen, die zur systematischen Untersuchung morphologischer Heterogenität zur Verfügung stehen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Anwendung von Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie in mehreren kürzlich veröffentlichten Arbeiten aus unserem Labor gelegt. Diese verdeutlichen sowohl das Ausmaß als auch die funktionale Relevanz der Morphologie bei Krebszellen und Zellen des gesunden Immunsystems. Dieses Kapitel schließt mit einem Fokus auf unsere jüngste Veröffentlichung, in der wir ein Werkzeug zur Profilerstellung der T Zell-Aktivierung anhand ihrer Morphologie entwickelt haben.

Im **Kapitel 3** präsentieren wir die Mehrheit der in dieser Arbeit generierten Daten unter dem Titel "Zellarchitektur formt die Reaktion der naiven T Zelle". Mit Hilfe von Hochdurchsatz-Fluoreszenzmikroskopie und Deep Learning zeigen wir, dass die Heterogenität in der subzellulären Architektur von naiven CD8 T Zellen zum Zeitpunkt der Aktivierung ihre kurz- und langfristigen Reaktionen auf Antigene vorherbestimmt oder tatsächlich "formt". Diese architektonische Heterogenität, definiert durch das Vorhandensein (diese Zellen werden als T_{\emptyset} , ausgesprochen als "gestreift" bezeichnet) oder das Fehlen (T_{\circ} , ausgesprochen als "konventionell") tiefer Kernhüllen-Einstülpungen, wird dynamisch während der T Zell-Entwicklung, Aktivierung und Differenzierung koordiniert. Nach antigenischer Stimulation von T Zellen werden T_{\emptyset} Architekturen morphologisch polarisiert und zeigen eine stärkere T Zell-Rezeptor (TCR)-Signaltransduktion

in einem von erhöhtem Calcium-Einstrom abhängigen Mechanismus. Anschließend proliferieren T_0 -Architekturen hauptsächlich zu größeren TCF1⁻ Effektor-ähnlichen Kolonien, während T_0 -Architekturen bevorzugt zu TCF1⁺ Gedächtnisvorläufern differenzieren. Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit präsentierte Daten, dass die zelluläre Architektur ein intrinsischer Prädeterminant der frühen TCR-Signalantwort und der anschließenden Zellschicksalsentscheidungen individueller naiver T Zellen ist.

Schließlich werden wir im **Kapitel 4** die Auswirkungen unserer Erkenntnisse auf die T Zell-Biologie und darüber hinaus diskutieren. Zusätzliche vorläufige Daten und Experimente, die unsere zukünftigen Pläne in diesem Forschungsfeld skizzieren, werden im Detail besprochen. Insbesondere wird der Fokus auf die Verbesserung der aktuellen technologischen Grenzen sowie auf die Erweiterung unserer Erkenntnisse in komplexeren physiologisch relevanten Kontexten liegen.

Zusammenfassend zeigt die in dieser Arbeit präsentierte Daten eine grundlegende Rolle der zellulären Architektur bei der Beeinflussung der funktionellen Reaktionen von T Zellen auf Antigene auf. Wir hoffen, dass dieses Wissen in Zukunft genutzt werden kann, um die Funktion von T Zellen in den Bereichen virale Immunologie, Impfung und Immunantworten gegen Krebs weiter zu untersuchen, vorherzusagen und zu manipulieren.