

**The impact of the TCL1A oncogene on
mitotic progression and its risk-group
associated proteome in CLL**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Christoph Markus Aszyk

aus Danzig (Polen)

Copy-Star Druck & Werbung GmbH, Köln

2017

Berichterstatter (Gutachter): Prof. Dr. Angelika Noegel

Prof. Dr. Peter Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2017

Abstract

Despite recent highly efficient treatment regimens in chronic lymphocytic leukemia (CLL), particular subsets of this still incurable disease remain problematic. This refers to cases that carry chromosomal deletions in the 11q and 17p regions, affecting the minimally deleted loci of the *ATM* (-11q) and *TP53* (-17p) genes, respectively. Both molecules represent major regulators of the DNA damage response (DDR) / cell cycle progression and are centrally implicated in general processes of carcinogenesis. *T-cell leukemia/lymphoma 1A* (*TCL1A*) is a lymphoid proto-oncogene whose aberrant upregulation and prognostic impact has been reported for a variety of mature T- and B-cell leukemias, most prominently CLL. Preliminary work from our group demonstrated *TCL1A* to be overexpressed in the majority of CLL. There, it acts as a sensitizer in B-cell receptor signaling and predicts inferior therapy responses. *TCL1A* is a small adapter protein that lacks enzymatic activity or DNA binding domains and is thought to execute its function through stabilizing protein-protein interactions. It was shown to physically interact with the kinases *AKT* and *ATM*, both representing molecules that govern cell survival in the context of an adequate DDR. However, the spectrum of molecular and cell-biological consequences of *TCL1A* dysregulation is not fully reflected by its currently recognized effectors, raising a need for further studies.

In previous work, our group discovered a cell cycle dependent regulation of *TCL1A* in CLL tissues. Furthermore, our mass spectrometric (MS) analysis of *TCL1A* protein complexes in cell line systems identified novel interacting partners, among which were central players of the mitotic checkpoint complex (MCC), namely the proteins *CDC20*, *CDK1*, and *MAD2*. Existing knowledge and our preliminary data strongly suggest the involvement of *TCL1A* in cell cycle control and DNA damage response pathways. In this context, three major aspects were to be addressed: (i) what are the molecular mechanisms of *TCL1A*-mediated disturbances in checkpoint transition, (ii) at which stages of leukemic progression and (iii) in which biologic disease subsets are these *TCL1A* effects most relevant? For (i), we have analyzed subcellular localization, the binding domains as well as the impact of *TCL1A* on the activity, stability, and the functional performance of *CDC20*. *TCL1A*'s subcellular localization in cultured B-cells revealed a prominent co-localization with the key MCC regulators *CDC20*, *CDK1*, and *MAD2*. In addition, employing site-directed mutagenesis we identified four amino acids within the *CDC20* protein sequence that

were essential to interact with TCL1A. Importantly, the mutation of one amino acid within CDC20, crucial for its interaction with MAD2, significantly reduced the formation of CDC20-TCL1A protein complexes. Under (ii), we also showed that TCL1A overexpression abrogated normal cell cycle progression in cultured B-cells and in lymphocytes from *E μ -TCL1A* mice. In line with that, constitutively expressed TCL1A influenced the expression of key cell cycle proteins (CDC20, Cyclin A, etc.) and the induced activation of a DDR (e.g. impaired p53 phosphorylation) only in TCL1A-tg advanced leukemic cells compared to pre-leukemic or wild-type splenocytes. In (iii), we performed a quantitative MS-based analysis of TCL1A interacting proteins isolated from different genetic / prognostic CLL subsets: 'no go' patients characterized by early-stage CLL with an indolent clinical course under a 'watch & wait' strategy (N=5); 'slow go' cases with advanced disease stage and in need for treatment, but absence of high-risk genetic lesions (N=5); and cytogenetically high-risk CLL carrying -11q (N=3) or -17p (N=7) aberrations. In order to identify TCL1A interacting partners specific to CLL B-cells, we compared the TCL1A interactome of CLL to the TCL1A interactome of healthy B-cells isolated from human tonsils. We identified 1442 TCL1A-interacting proteins among which 195 were found exclusively in CLL (not in healthy B-cells). We demonstrated that advanced CLL comprised a larger TCL1A interactome than indolent cases. Furthermore, -17p CLL showed the most distinct TCL1A interactome with a unique implicated signaling pattern. Finally, gene set overrepresentation analysis revealed cell cycle and DNA damage pathways as central players of molecular events mediated by TCL1A.

In summary, in completion of all aims, we have better defined the TCL1A-mediated impact on mitotic progression and linked DNA damage repair, and we identified a risk-group associated interactome of TCL1A confirming established and suggesting novel molecular modes of action.

Zusammenfassung

Trotz neuester und äußerst effizienter Behandlungsschemata bei chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), bleiben einzelne Untergruppen dieser unheilbaren Krankheit weiterhin problematisch therapierbar. Das betrifft insbesondere Fälle, die eine chromosomale Deletion in den Regionen 11q und 17p tragen, welche die minimal deletierten Stellen der Gene von *ATM* (-11q) beziehungsweise *TP53* (-17p) beeinflussen. Beide Moleküle repräsentieren Hauptregulatoren der DNS-Schadensantwort (DDR) / Zellzyklusprogression und sind zentral bei allgemeinen Prozessen der Karzinogenese beteiligt. *T-cell leukemia/lymphoma 1A (TCL1A)* ist ein lymphoides Proto-Onkogen, über dessen aberrante Hochregulierung und prognostische Wirkung für eine Vielzahl von reifen T- und B-Zell-Leukämien berichtet wurde, insbesondere bei der CLL. Vorarbeiten aus unserer Gruppe zeigten, dass *TCL1A* in der Mehrheit der CLL überexprimiert ist. Dort wirkt es als Sensibilisator des B-Zell-Rezeptorsignalweges und prognostiziert minderwertige Therapieantworten. *TCL1A* ist ein kleines Adapterprotein, dem enzymatische Aktivität oder DNS-Bindungsdomänen fehlen. Es wird angenommen, dass es seine Funktion durch stabilisierende Protein-Protein Wechselwirkungen ausübt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *TCL1A* physikalisch mit den Kinasen *AKT* und *ATM* interagiert, beides Moleküle, die das Zellüberleben im Zusammenhang mit einer adäquaten DDR bestimmen. Jedoch wird das Spektrum der molekularen und zellbiologischen Konsequenzen der *TCL1A*-Dysregulation nicht vollständig von den derzeit anerkannten Effektoren reflektiert, was die Notwendigkeit weiterer Studien erfordert.

In vorhergehenden Arbeiten entdeckte unsere Gruppe eine zellzyklusabhängige Regulation von *TCL1A* im CLL-Gewebe. Außerdem identifizierte unsere massenspektrometrische (MS) Analyse von *TCL1A*-Proteinkomplexen in Zelllinien neue Interaktionspartner, darunter auch zentrale Akteure des mitotischen Kontrollpunkt-Komplexes (MCC), nämlich die Proteine *CDC20*, *CDK1* und *MAD2*. Bestehendes Wissen und unsere vorläufigen Daten deuten stark auf die Beteiligung von *TCL1A* an der Zellzykluskontrolle als auch DNS-Schadensantwort hin. In diesem Zusammenhang sollten drei wesentliche Aspekte behandelt werden: (i) was sind die molekularen Mechanismen von *TCL1A*-vermittelten Störungen im Kontrollpunktübergang, (ii) in welchen Stadien des leukämischen Fortschritts und (iii) in welchen biologischen Erkrankungsuntergruppen sind diese *TCL1A*-Effekte am relevantesten? Für (i) haben wir die subzelluläre Lokalisierung, die Bindungsdomänen sowie die Auswirkungen von *TCL1A* auf die Aktivität, Stabilität und die funktionelle Leistungsfähigkeit von *CDC20* analysiert. Die subzelluläre Lokalisierung von *TCL1A* in kultivierten B-Zellen zeigte eine deutliche Co-Lokalisierung

mit den essentiellen MCC-Regulatoren CDC20, CDK1 und MAD2. Zusätzlich wurden – unter Verwendung einer zielgerichteten Mutagenese – vier Aminosäuren innerhalb der CDC20-Proteinsequenz identifiziert, die für die Interaktion mit TCL1A wesentlich sind. Wichtig ist, dass die Mutation von nur einer Aminosäure innerhalb von CDC20, die für ihre Wechselwirkung mit MAD2 entscheidend ist, die Bildung von CDC20-TCL1A-Proteinkomplexen signifikant reduziert hat. Unter (ii) zeigten wir auch, dass die TCL1A-Überexpression die normale Zellzyklusprogression in kultivierten B-Zellen und in Lymphozyten von *E μ -TCL1A*-Mäusen aufhebt. In Übereinstimmung dazu beeinflusste das konstitutiv exprimierte TCL1A die Expression von Schlüsselzellzyklusproteinen (CDC20, Cyclin A, usw.) und die induzierte Aktivierung einer DDR (z.B. beeinträchtigte p53-Phosphorylierung) nur in TCL1A-tg fortgeschrittenen Leukämiezellen im Vergleich zu prä-leukämischen oder wild-typ Splenozyten. Bei (iii) haben wir eine quantitative MS-basierte Analyse von TCL1A-Interaktionsproteinen durchgeführt, die aus verschiedenen genetischen / prognostischen CLL-Untergruppen isoliert wurden: „no go“-Patienten, gekennzeichnet durch eine frühstufige CLL mit einem indolentem klinischem Verlauf unter einer „watch & wait“-Strategie (N=5); „slow go“-Fälle mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium und Behandlungsbedarf, jedoch ohne genetische Hochrisiko Läsionen (N=5); und zytogenetisch definierte Hochrisiko CLL mit -11q (N=3) oder -17p (N=7) Aberrationen. Um TCL1A-Interaktionspartner zu identifizieren, die spezifisch für CLL-B-Zellen sind, haben wir das TCL1A-Interaktom von CLL mit dem TCL1A-Interaktom von gesunden B-Zellen, die aus menschlichen Tonsillen isoliert wurden, verglichen. Wir identifizierten 1442 TCL1A-Interaktionsproteine, unter denen 195 exklusiv in CLL (nicht in gesunden B-Zellen) gefunden wurden. Wir haben gezeigt, dass die fortgeschrittene CLL ein größeres TCL1A-Interaktom als die indolenten Fälle umfasst. Darüber hinaus präsentierte die -17p CLL das merklichste TCL1A-Interaktom mit einem einzigartigen Signalisierungsmuster. Schließlich wies die Gen-Set-Überrepräsentationsanalyse auf, dass Zellzyklus- und DNS-Schadenssignalwege die zentralen Akteure von TCL1A-vermittelten molekularen Ereignissen sind.

Zusammenfassend, unter Vollendung aller Zielsetzungen konnten wir die TCL1A-vermittelten Auswirkungen auf die mitotische Progression und die verknüpfte DNS-Schadensreparatur besser definieren. Außerdem konnten wir ein Risikogruppen-assoziiertes TCL1A-Interaktom identifizieren, das bekannte als auch neue molekulare Wirkmechanismen von TCL1A aufzeigt.