

## **Abstract and Zusammenfassung**

### **Abstract**

T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL) is a rare ( $\approx 0.6/\text{million}/\text{yr.}$ ) malignancy yet represents the most common mature T-cell leukemia in Europe and North America. It is a chemotherapy-resistant and poor-prognostic tumor (median overall survival  $\approx 20\text{-}36$  months). Its T-cell differentiation stage and effector functions are insufficiently characterized. Constitutive transcriptional activation of the *T-cell leukemia 1A* (*TCL1A*) oncogene is considered the initiating leukemogenic event, but the concise mechanisms of transformation remain elusive. Our functional concept of *TCL1A* established it as an enhancer of T-cell receptor (TCR) signaling as the most central relay of T-cell proliferation and differentiation. However, the pro-leukemic relevance of an inherently postulated cooperative *TCL1A* enhanced TCR signaling is not established. Furthermore, the exact differentiation stage and the functional effector properties of the T-PLL T-cell are not well described.

We performed global gene expression profile (GEP) analyses of primary T-PLL cells ( $n=70$  cases) in comparison to healthy-donor derived pan-memory T-cells, central memory T-cells (TCM), and naïve pan T-cells ( $n=10$  each). Principle component analyses revealed that T-PLL cases cluster to a much higher degree with memory T-cells than with naïve T-cells. Furthermore, T-PLL cells carried signatures that were enriched for published 'memory' gene sets rather than those of naïve T-cells. More detailed characterization showed a stronger similarity of T-PLL GEPs with those of the TCM subset ( $n=10$ ) of pan-memory T-cells. Comprehensive immunophenotyping on 115 T-PLL revealed a spectrum of memory-type differentiation with predominant CM stages and frequent non-canonical patterns. Virtually all cases expressed a TCR and/or the CD28-coreceptor, but without overrepresentation of genetic or surface-V $\beta$  clonotypes. T-PLL cells revealed an activated phenotype (CD25, CD38, CD69) and highest multi-parameter activation scores correlated with inferior clinical outcomes. Fittingly, they also showed resistance to stimulation-induced cell death and agonistic CD95 ligation. TCR-engagement of T-PLL cells evoked an altered metabolic signature and a prominent Th1-cytokine program in multiplex cytokine array analyses. Loss of negative-regulatory TCR-co-receptors (e.g. CTLA4 and LAG3) and overexpressed *TCL1A* distinguished the typically TCR-hyper-responsive T-PLL lymphocytes from normal T-cells. In fact, enforced *TCL1A* enhanced TCR-mediated kinase phospho-activation (e.g. SLP76, LAT, AKT, ERK) and second-messenger generation as well as reduced input thresholds for IL2 release. In a biomathematical model we fitted logistic response kinetics of IL2 secretion to three 3-level (-, +, ++) of covariates (CD3, CD28, *TCL1A*). Here, increasing *TCL1A* expression substantially augmented the initial exponential rise of IL2 but did not influence the saturation level of IL2. Such features were resembled in mice of

TCL1A-initiated protracted T-PLL development. Equipped with a chimeric-antigen-receptor (CAR) against carcinoembryonic antigen (CEA), these *Lck<sup>pr</sup>-hTCL1A<sup>tg</sup>* T-cells gained a pre-leukemic growth advantage in scenarios of continuous low-level receptor stimulation *in vivo*. In summary, we establish that T-PLL cells are akin to antigen-experienced memory T-cells, phenotypically and functionally. T-PLL shares its gene expression signatures with (central) memory T-cells, which implicates some antigen-experience of the T-PLL cell or its precursor. Detailed immunophenotyping reveals a mostly memory-type character. T-PLL cells retain functional effector responses to TCR stimulation, but show aberrantly high-level expression of activation markers, diminished regulated death responses, and reduced expression of regulators of activation. We further established that TCL1A acts as a sensitizer to TCR input, which is pro-leukemogenic, and drives accumulation of memory-type cells that utilize amplified, hence permissive, low-level cognate antigen input.

## Zusammenfassung

Bei der T-Zell Prolymphozyten Leukämie (T-PLL) handelt es sich um eine seltene ( $\approx 0,6$ /Million/Jahr), bösartige Erkrankung, die aber als häufigste reifzellige T-Zell Leukämie in Europa und Nord Amerika in Erscheinung tritt. Die Leukämie ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (mittleres Überleben  $\approx 20-36$  Monate) und weist eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf. Der Differenzierungsgrad der T-Zelle sowie deren Effektorfunktionen sind nur unzureichend charakterisiert. Konstitutive transkriptionelle Aktivierung des Onkogens *T-cell leukemia 1A (TCL1A)* wird als initiales Leukämie-induzierendes Ereignis angesehen. Allerdings bleibt der präzise Transformationsmechanismus weiterhin schwer fassbar und offen. In unserem funktionellen Konzept verstehen wir TCL1A als Verstärker von T-Zell Rezeptor (TZR) Signalen, dem zentralsten und essentiellsten Vernetzungspunktes in der Regulation von T-Zell Wachstum sowie Differenzierung. Allerdings konnte diese pro-leukämische Kooperation von TCL1A-TZR Signalen bislang nicht bestätigt werden.

Wir führten Genexpressionsanalysen an primären T-PLL Zellen (n=70 Fälle) durch und verglichen die Daten mit Expressionsprofilen der gesamt Gedächtnis T-Zellen Population, der Populationen der zentralen Gedächtnis T-Zellen sowie naiven T-Zellen gesunder Spender (jeweils n=10). Eine Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass T-PLL Fälle sich besser mit Gedächtnis T-Zellen gruppieren lassen als mit naiven T-Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass T-PLL Zellen Genexpressionssignaturen aufwiesen, die eine Anreicherung für bereits veröffentlichte Gengruppen von Gedächtnis T-Zellen anstatt derer von naiven T-Zellen zeigten. Eine tiefere Charakterisierung belegte eine starke Ähnlichkeit der Genexpressionsprofile von T-PLL Zellen mit denen von zentralen Gedächtnis T-Zellen (n=10) der gesamt-Gedächtnis T-Zellen. Umfassende Immunphenotypisierung von 115 T-PLL Fällen zeigte ein Spektrum von Gedächtnis T-Zell Differenzierungen mit einem prädominanten Anteil von zentralen Gedächtnis T-Zell Differenzierungsstufen sowie häufig nicht kanonischen Gedächtnis T-Zell Marker Mustern. Nahezu alle untersuchten T-PLL Fälle exprimierten den TZR und/oder den CD28 co-Rezeptor ohne die Überrepräsentation von genetischen oder Oberflächen V $\beta$  Klonotypen. T-PLL Zellen zeigten zudem einen aktivierten Phenotyp (CD25, CD38, CD69) wobei hohe multi-Parameter Aktivierungswerte mit einem schlechteren klinischen Ausgang assoziiert waren. Hierzu passend wiesen T-PLL Zellen eine Resistenz zum Stimulations-induzierten Zelltod sowie agonistisch wirkender CD95 Ligation auf. Bindung und Aktivierung des TZR von T-PLL Zellen führte zu einer veränderten metabolischen Signatur und einem prädominanten Th1-Zytokin Sekretionsprofil in multiplex Zytokinarray Analysen. Der Verlust von negativ regulatorischen TZR co-Rezeptoren (z.B. CTLA4 und LAG3) sowie die Überexpression von TCL1A unterschieden den typisch TZR-hyper-responsiven T-PLL

Lymphozyten von der gesunden T-Zelle. Tatsächlich verstärkte die Überexpression von TCL1A die TZR vermittelte Kinase phospho-Aktivierung (z.B. SLP76, LAT, AKT, ERK), die Freisetzung sekundärer Botenstoffe und setzte die notwendige Aktivierungsschwelle für die IL2 Sekretion herab. In einem biomathematischen Modell modellierten wir logistische Reaktionskinetiken der IL2 Sekretion unter der Verwendung von drei Intensitätsebenen (-, +, ++) sowie drei co-Variablen (CD3, CD28, TCL1A). Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine ansteigende TCL1A Expression den initialen exponentiellen IL2 Anstieg erheblich unterstützte aber nicht die Sättigungsmengen von IL2 beeinflusst. Diese Eigenschaften wurde ebenfalls in Mäusen mit TCL1A initiiertes T-PLL wiedergespiegelt. T-Zellen von *Lck<sup>pr</sup>-hTCL1A<sup>tg</sup>* Mäusen, die mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) gegen das Carcinoembryogene Antigen (CEA) ausgestattet wurden, erhielten einen prä-leukämischen Wachstumsvorteil unter Bedingungen von kontinuierlicher CEA Antigen Stimulation geringer Intensität im lebenden Tier.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir die T-PLL Zelle als eine Antigen-erfahrene Gedächtnis T-Zelle verstehen sowohl immunophänotypisch als auch funktionell. Die Genexpressionssignaturen der T-PLL ähneln sich dem der (zentralen) Gedächtnis T-Zelle, was auf einen Antigenkontakt der T-PLL Zelle oder deren Vorläufer hindeutet. Eingehende Immunophänotypisierung zeigte einen prädominanten Gedächtnis-Zell-Charakter. T-PLL Zellen bewahren ihre funktionellen Effektorzellfunktionen im Zug einer TZR Stimulierung, zeigen aber eine abweichend hohe Expression von Aktivierungsmarkern, eine verminderte Antwort auf Zelltod Signale sowie eine reduzierte Expression von Regulatoren der Zellaktivierung. Weiterhin konnten wir zeigen, dass TCL1A die Zellen für TZR Signale sensibilisiert, was die Entwicklung einer Leukämie begünstigt, und zur Anreicherung von Gedächtnis T-Zellen führt, welche durch permissive Signale von vermindert auftretenden Antigenen verstärkt wird.