

***In vivo* Functional Characterization  
of LYN Kinase in the Pathogenesis  
of Chronic Lymphocytic Leukemia**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Phuong-Hien Nguyen**

aus Hanoi, Vietnam

*MIKROFORM, Ketsch*

*im Jahr 2016*

**Berichtersteller:** PD. Dr. Thomas Wunderlich  
Prof. Dr. Thorsten Hoppe  
Prof. Dr. Michael Hallek

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.01.2015

## Abstract of the Dissertation

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common B cell leukemia in the elderly, which is still incurable by conventional chemoimmunotherapy. CLL cells are recognized as “addicted to the host” because of their tight dependence on a permissive tumor microenvironment consisting of various components such as macrophages, nurse-like cells, T cells, stromal and other cell types. Pro-survival signaling within CLL cells relies heavily on the B cell receptor (BCR) pathway, which is greatly enhanced in CLL cells compared to healthy B cells. The most widely used model for CLL studies is the E $\mu$ -TCL1 transgenic mice, which develop a B lymphoproliferative disease highly similar to the aggressive form of human CLL.

LYN kinase, a member of the SRC family kinases, is associated with the BCR complex and is one of the molecules activated very early following BCR stimulation. LYN is considered a modulator of B cell homeostasis due to its ability to phosphorylate both activators and inhibitors downstream of BCR signaling. LYN is found to be overexpressed in CLL cells, and is associated with CLL resistance to apoptosis. Besides, LYN is also reported to have important functions in a wide range of other cell types, both of the hematopoietic and non-hematopoietic compartments. Involvement of LYN in numerous cellular processes such as proliferation, migration, adherence, as well as oncogenic development renders this molecule a highly interesting target for cancer research.

To provide more insights into the role of LYN kinase in CLL pathogenesis *in vivo*, we have generated E $\mu$ -TCL1 transgenic LYN deficient mice (TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>-/-</sup>) and characterized the development of malignant CLL cells in these mice in comparison to the control E $\mu$ -TCL1 transgenic mice (TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>wt/wt</sup>).

Our study shows that complete ablation of LYN resulted in significantly hindered CLL development *in vivo*. In comparison to TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>wt/wt</sup> mice, TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>-/-</sup> mice had significantly reduced expansion of CLL cells, as well as reduced leukocyte count in the peripheral blood at the leukemic stage. Besides, TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>-/-</sup> mice displayed a decreased infiltration of malignant B cells in lymphoid tissues such as spleen, liver, lymph node and bone marrow.

Although TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>-/-</sup> mice showed hindered development of TCL1-induced CLL, our data suggest it is not only due to LYN deficiency in the B cell compartment of these mice. Indeed, CLL cells of TCL1<sup>+wt</sup> LYN<sup>-/-</sup> mice showed enhanced proliferation, early transformation, as well

as comparable *ex vivo* survival to TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>wt/wt</sup> B cells. Furthermore, TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>-/-</sup> B cells also maintained the capability to induce full-blown leukemia in healthy recipients.

Notably, TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>-/-</sup> mice developed a skewed microenvironment, which might contribute to CLL down regulation. The LYN<sup>-/-</sup> mice did not support engraftment of TCL1-induced leukemic B cells in transplantation experiments, leading to a significantly delayed CLL progression and prolonged survival of LYN<sup>-/-</sup> recipients. More strikingly, aged LYN<sup>-/-</sup> mice totally rejected CLL transplantation. Additionally, loss of LYN, specifically in the hematopoietic system of chimeric recipients, led to a moderate reduction of CLL expansion compared to WT chimeras.

Taken together, our results point to a complex regulation of LYN signaling in CLL involving not only the leukemic cells, but above all, the microenvironment that has never been reported until now. We suggest that expression of LYN in both hematopoietic and non-hematopoietic compartments might contribute to the progression of CLL *in vivo*.

## Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste B-Zell-Leukämie der Erwachsenen in der westlichen Welt. Das Überleben der CLL-Zellen hängt in starkem Maße von den kontinuierlichen Interaktionen zwischen Tumorzellen und extrazellulären Faktoren des Mikromilieus ab, die durch die verstärkte B-Zellrezeptor (BZR) Signaltransduktion das Überleben der CLL-Zellen fördern. Die E $\mu$ -TCL1 transgenen Mäuse entwickeln eine CLL-ähnliche Erkrankung, und werden als adäquates Modell für die Erforschung der CLL anerkannt.

LYN Kinase ist mit dem BZR assoziiert und wird durch BZR-Stimulierung direkt aktiviert. LYN wird als Modulator der B-Zell-Homeostasis bezeichnet, da es sowohl die aktivierende Kinasen als auch die inhibierende Moleküle der BZR Signal-Kaskade phosphorylieren kann. In CLL-Zellen ist LYN überexprimiert und kann die Apoptose behindern.

Der Einfluss von LYN auf die CLL-Entwicklung *in vivo* wird durch Vergleichen der TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>-/-</sup> und TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>wt/wt</sup>-Mäuse getestet. Die TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen eine signifikant reduzierte Tumormasse sowie eine verringerte Infiltration der Tumorzellen in lymphatischen Organen auf. Dennoch lässt sich beobachten, dass die B-Zellen der TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>-/-</sup>-Mäusen mehr proliferieren und schneller transformieren können. Zusätzlich sind B-Zellen der TCL1<sup>+wt</sup>LYN<sup>-/-</sup>-Mäuse imstande, eine ausgeprägte Leukämie in Wildtyp-Empfänger-Mäusen zu induzieren.

Erstaunlicherweise wird gezeigt, dass der LYN-defiziente Milieu das Anwachsen der CLL-Zellen erschwert. Transplantierte CLL-Zellen in LYN<sup>-/-</sup>-Empfänger-Mäusen wachsen im Vergleich zum Wildtyp-Empfänger-Mäusen erheblich verzögert an. Auch die Transplantation in chimäre Mäuse mit LYN<sup>-/-</sup> hämatopoietischen System, die durch allogene Knochenmarktransplantation rekonstruiert wurden, vermindert das Anwachsen der CLL-Zellen.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit erstmals, dass LYN als essenzieller Faktor des CLL-Mikromilieus fungiert, dessen Expression sowohl zum Teil in hämatopoietischen Zellen als auch in nicht-hämatopoietischen Zellen wichtig für das Anwachsen der CLL ist.