

**Novel modes of action of the TCL1A onco-protein in the
deregulation of cell cycle, DNA damage response, and B-cell
receptor signaling**

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Johanna Stachelscheid

aus Olpe

Copy-Star Druck & Werbung GmbH, Köln

2023

Berichtersteller:

Prof. Dr. Marcus Krüger

Prof. Dr. Matthias Fischer

Tag der mündlichen Prüfung:

26.04.2023

Summary

The oncoprotein T-cell leukemia/lymphoma 1A (TCL1A) is a 14 kDa adapter protein that lacks enzymatic or DNA-binding activity. It is expressed in several embryonic and fetal tissues, and early-stage B and T cells, where it is silenced along maturation. Importantly, TCL1A is strongly upregulated in a variety of hematological malignancies and some solid tumors. It was first discovered in T-prolymphocytic leukemia (T-PLL), in which chromosomal aberrations lead to the upregulation of *TCL1A* expression, which is considered the initiating event in this highly aggressive disease. Also in chronic lymphocytic leukemia (CLL), TCL1A is overexpressed in most patients and high expression correlates with adverse clinical outcomes. In contrast to T-PLL, there is a near absence of genetic aberrations involving *TCL1A* as the normal B cell of origin of most CLL carries already a strong TCL1A transcriptional program. The extent and nature of the contribution of TCL1A overexpression to CLL's pathogenesis is not well defined. Development of a CLL-like disease in mice expressing human TCL1A under the B-cell-specific *E μ* enhancer (*E μ -TCL1A*) argues for a relevant and direct role. Despite extensive investigations of its oncogenic functions in regulating stemness and survival, such as increasing AKT autophosphorylation and driving NF- κ B signaling, the full spectrum of TCL1A-effector functions and the exact molecular concept of TCL1A-mediated leukemogenesis have not been fully revealed. Therefore, we aimed to characterize currently undescribed TCL1A effector molecules and affected pathways and to decipher their influence on the TCL1A-induced pathogenesis of CLL more systematically. We addressed this by (1) identifying the influence of TCL1A's subcellular localization on its oncogenic potential, (2) characterizing the baseline and stress-induced TCL1A interactome, and (3) analyzing its functional impact on identified interactors and pathways.

To assess at which subcellular site TCL1A exerts its strongest oncogenic impact, we transplanted wild type mice with hematopoietic stem cells expressing generic TCL1A or its variants that localize to the membrane or the nucleus. Mice transplanted with cells expressing nuclear TCL1A showed the shortest survival, supporting a crucial role of TCL1A's nuclear functions in lymphoma pathogenesis. Furthermore, our mass spectrometry (MS)-based analysis of the TCL1A interactome identified many TCL1A-interacting proteins that regulate the cell cycle, DNA damage response (DDR) pathways, and B-cell receptor (BCR) signaling, suggesting that they play an active role in TCL1A-mediated leukemogenesis. We investigated here the functional influence of TCL1A on these three pathways.

We identified as a novel TCL1A interactor the mitotic checkpoint protein CDC20, which is crucial in the regulation of timely separation of the sister chromatids during mitosis. CDC20 functions as a coactivator of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), thereby driving mitotic exit, but is also part of the mitotic checkpoint complex (MCC), inhibiting the APC/C. Via in-silico modeling and experimental validations, we defined the crucial domains

mediating the direct TCL1A-CDC20 interaction and identified an abrogating effect of TCL1A on the engagement of CDC20 with the MCC protein MAD2. In line with the diminished activity of the MCC, we observed an accelerating mitotic transition and a higher rate of aneuploidy in TCL1A-transgenic cell lines and B cells from *E μ -TCL1A* mice. Additionally, we correlated low *CDC20* expression with higher *TCL1A* expression, as well as with a more genomically unstable and aggressive disease in a large CLL patient cohort. Via a syngeneic transplantation model using a murine CLL cell line with a *Cdc20*-knockdown, we could validate this pro-leukemic impact of reduced CDC20. Together, we discovered a novel function of TCL1A on cell cycle transition and validated the importance of its effector CDC20 in CLL.

The observed genomic instability phenotype induced by TCL1A and the pronounced enrichment of DDR proteins in the TCL1A interactome further suggested a deregulating role of TCL1A on the DDR. The central DDR kinase ATM, which is frequently deleted and/or mutated in CLL, is a known TCL1A interactor and was validated in our MS analysis. We discovered a diminished activation of ATM and its target p53 upon genotoxic stress in TCL1A positive cells. In line with this, the expression of p53 target genes upon induced DNA damage was strongly affected in B cells of *E μ -TCL1A* mice. We implicate this attenuated sensing of DNA damage and impaired induction of downstream signaling in the observed chemoresistance and genomic instability phenotype of cells with high TCL1A expression.

Apart from its effect on proper cell cycle and DDR signaling, TCL1A also promotes cell survival, e.g. by increasing AKT activation and enhancing responsiveness to BCR stimulation. However, the exact effect of TCL1A on BCR downstream signaling has not been addressed sufficiently. Therefore, we analyzed the impact of TCL1A on the BCR-induced phospho-proteome via MS to identify potentially crucial targets in augmenting its downstream signaling. Importantly, several proteins of the BCR signaling cascade and the cell cycle were differentially phosphorylated in the presence (vs absence) of TCL1A, including the tyrosine kinase SYK and the histone acetyltransferase p300, both involved in proximal BCR signal transduction. We validated the TCL1A-associated increased phospho-activation of SYK, which was abrogated when inhibiting p300, implicating both proteins in the TCL1A-mediated enhancement of BCR signaling, and thereby driving a pronounced survival signaling.

Taken together, our data give significant novel insights into the molecular mechanisms of TCL1A-induced leukemogenesis. We propose that the cross-talks between an enhanced survival signaling and deregulation of the DDR and the cell cycle checkpoints, drive genomic instability and malignant transformation. Through this comprehensive characterization of TCL1A's function, we gained a deeper understanding of the mechanisms involved in CLL pathogenesis, which could also potentially be applied to other malignancies harboring TCL1A overexpression. It will also help uncover potential vulnerabilities that could be exploited for more targeted treatment approaches.

Zusammenfassung

Das Onko-Protein T-cell leukemia/lymphoma 1A (TCL1A) ist ein 14 kDa großes Adapterprotein ohne enzymatische oder DNA-bindende Aktivität. Es wird in verschiedenen embryonalen und fötalen Geweben sowie in unreifen B- und T-Zellen exprimiert, wo es während des Reifungsprozesses herunterreguliert wird. Zudem ist es in vielen hämatologischen Neoplasien und einigen soliden Tumoren hochreguliert. Erstmals wurde es in der T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL) beschrieben, wo chromosomale Aberrationen zu einer Hochregulierung der *TCL1A* Expression führen, was als tumor-initiiierendes Ereignis angesehen wird. Auch in der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) ist TCL1A überexprimiert und korreliert mit einer schlechteren Prognose. Jedoch resultiert hier seine Überexpression nicht aus genetischen Aberrationen, sondern folgt vornehmlich der Expression der CLL-Vorläuferzellen, weshalb sein Beitrag zur CLL-Pathogenese weniger gut definiert ist. Jedoch impliziert die Entwicklung einer CLL-ähnlichen Erkrankung in Mäusen, die TCL1A unter dem B-Zell-spezifischen *E μ* -Enhancer exprimieren, eine direkte Rolle auf die CLL-Pathogenese. Trotz umfangreicher Untersuchungen seiner onkogenen Funktionen in Bezug auf Überlebens-Signale, z. B. mediert durch die Verstärkung der AKT-Autophosphorylierung und des NF- κ B Signalwegs, sind das gesamte Spektrum der TCL1A-Effektor-Funktionen und das genaue Konzept der TCL1A-vermittelten Leukämogenese noch unvollständig geklärt. Daher wollen wir bisher unbeschriebene TCL1A-Effektormoleküle und betroffene Signalwege charakterisieren und ihren Einfluss auf die TCL1A-induzierte CLL-Pathogenese entschlüsseln. Zu diesem Zweck haben wir (1) den Einfluss der subzellulären Lokalisierung von TCL1A auf sein onkogenes Potential untersucht, (2) das kontext-spezifische Interaktom von TCL1A charakterisiert und (3) seine funktionellen Auswirkungen auf identifizierte Interaktoren und Signalwege analysiert.

Um festzustellen, welche subzelluläre Lokalisierung von TCL1A die größte onkogene Wirkung zeigt, transplantierten wir Mäuse mit hämatopoetischen Stammzellen, die generisches TCL1A oder Varianten, die an die Membran oder in den Kern lokalisieren, exprimieren. Mäuse, denen Zellen mit nuklearem TCL1A transplantiert wurden, zeigten das kürzeste Überleben, was für einen wichtigen Einfluss seiner nuklearen Funktionen auf die Tumorphagenese spricht. Zudem identifizierten wir in unserer massenspektrometrischen (MS) Analyse des TCL1A-Interaktoms viele Interaktoren, die den Zellzyklus, den DNA-Schadensreaktionsweg (DSR) und den B-Zell-Rezeptor (BZR)-Signalweg regulieren, was darauf hindeutet, dass sie aktiv zu der onkogenen Funktion von TCL1A beitragen. Daher haben wir den funktionellen Einfluss von TCL1A auf diese drei Signalwege untersucht.

Wir identifizierten das mitotische Checkpoint-Protein CDC20 als TCL1A-Interaktor, welches für die rechtzeitige Trennung der Chromatiden während der Mitose entscheidend ist. CDC20 fungiert als Co-Aktivatoren des APC/C und treibt dadurch die Teilung der Tochterzellen voran. Zum anderen ist es auch Teil des mitotischen Checkpoint-Komplex (MCC) und hemmt den APC/C.

Durch In-silico-Modellierung und experimentelle Validierung definierten wir die Domänen, die in der direkten TCL1A-CDC20 Interaktion involviert sind und zeigten, dass TCL1A die Interaktion von CDC20 mit dem MCC-Protein MAD2 abschwächt. Übereinstimmend mit einer verminderten Aktivität des MCC beschleunigte TCL1A die Mitose und erhöhte die Aneuploidierate in Zelllinien und B-Zellen aus *Eμ-TCL1A* Mäusen. Zudem korrelierten wir eine niedrige *CDC20*-Expression mit einer höheren *TCL1A*-Expression sowie mit einer genomisch instabileren und aggressiveren Erkrankung in einer großen CLL-Kohorte. Mit Hilfe eines Transplantationsmodells, bei dem eine murine CLL-Zelllinie mit einem *Cdc20*-Knockdown transplantiert wurde, konnten wir diese pro-leukämische Auswirkung von reduziertem *CDC20* validieren. Insgesamt haben wir eine neue Funktion von TCL1A in der Zellzyklusregulierung identifiziert und die Bedeutung seines Effektors *CDC20* in der CLL bestätigt.

Der durch TCL1A induzierte Phänotyp der genomischen Instabilität und die hohe Anzahl an DSR-Proteinen innerhalb des TCL1A-Interaktoms deuten zusätzlich auf Deregulation des DSR durch TCL1A hin. Die zentrale DSR-Kinase ATM ist ein bekannter TCL1A-Interaktor und wurde in unserer MS-Analyse validiert. Wir zeigten in TCL1A-positiven Zellen eine verringerte Aktivierung von ATM und seinem Target p53 nach Induktion von DNA-Schaden. Entsprechend war die Expression von p53-Zielgenen als Reaktion auf DNA-Schäden in B-Zellen aus *Eμ-TCL1A* Mäusen stark beeinträchtigt. Zusammen könnte dies ursächlich für die beobachtete Chemoresistenz und genomische Instabilität von Zellen mit hoher TCL1A-Expression sein.

Zusätzlich zum Einfluss auf den Zellzyklus und den DSR, fördert TCL1A das Überleben von Zellen, z. B. durch verstärkte AKT-Aktivierung und BZR-Signale. Seine genaue Wirkung auf Letzteres wurde jedoch noch unzureichend untersucht. Daher haben wir den Effekt von TCL1A auf das BZR-induzierte Phospho-Proteom mittels MS analysiert, um Effektor-Proteine für die Stärkung der Signalübertragung zu identifizieren. Hierbei wurden mehrere differenziell phosphorylierte Proteine innerhalb der BZR-Signalkaskade identifiziert, wie z. B. die Tyrosinkinase SYK und die Histon-Acetyltransferase p300, die beide an der proximalen Signaltransduktion beteiligt sind. Wir bestätigten die erhöhte Phospho-Aktivierung von SYK in Anwesenheit von TCL1A, die durch die Hemmung von p300 aufgehoben werden konnte. Das deutet darauf hin, dass beide Proteine an der TCL1A-vermittelten Verstärkung der BZR-Signalgebung beteiligt sein könnten und so Überlebens-Signale steigern.

Unsere Daten liefern neue Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus der TCL1A-induzierten Leukämogenese. Wir vermuten, dass die verstärkten Überlebenssignale zusammen mit der Deregulierung der DSR und Zellzyklus Checkpoints die genomische Instabilität und Tumorgenese vorantreibt. Diese umfassende Charakterisierung der Funktion von TCL1A trägt zu einem besseren Verständnis der an der CLL-Entwicklung beteiligten Prozesse bei, was auf weitere TCL1A-positive Tumorentitäten übertragen werden könnte. Zudem können hierdurch neue Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien identifiziert werden.