

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most prevalent B-cell malignancies in the Western world. CLL cells rely heavily on their surrounding cells and soluble factors, constituting the tumor microenvironment (TME). Recently, the active contribution of tyrosine kinases such as LYN and BTK in TME cells to the leukemia-promoting niche has been demonstrated. In a Lyn-deficient environment, macrophages emerged as the central player responsible for the diminished supportive effect for CLL progression. To study the dialog of macrophages and CLL cells in a fully human setting, we used the monocyte-derived cell line THP-1. While CLL cells undergo apoptosis *in vitro* quickly, THP-1 macrophages have the potential to sustain CLL viability in culture over weeks.

Based on the significance of kinases in the TME of CLL, we aimed to create a library of tyrosine kinase knockout macrophage cell lines to investigate the potential roles of tyrosine kinases in the CLL-macrophage dialog. After a thorough evaluation of all technical parameters, we successfully established a functional arrayed CRISPR/Cas9 knockout screen of all known tyrosine kinases in the THP-1 cell line. Single gene knockout THP-1 macrophages were cocultured with CLL patient cells. The survival of CLL cells was measured via flow cytometry as read-out for the supportive capacity of the knockout feeder cells.

We discovered thirteen single-gene knockouts with consistently reduced CLL cell survival support. Interestingly, three members of the SRC family kinases (SFK), including LYN, were identified in our analyses. Additionally, two negative regulators of SFKs were identified, supporting the importance of SFK signaling in the macrophage-CLL dialog. Notably, the deletion of CSK, the primary negative regulator of SFKs, led to a robust decrease in CLL-feeding capacity. Furthermore, the apoptotic response of CLL cells induced by the BCL-2 inhibitor venetoclax was notably heightened in cocultures with CSK knockout THP-1 macrophages compared to control cocultures. These findings hint at a potential synergistic effect of the combination of CSK deletion and BCL-2 inhibition. Surprisingly, CSK deletion in macrophages resulted in a reduced phosphorylation profile and diminished the expression of important SFKs, including LYN, across different macrophage cell lines. This decrease was dependent on the kinase activity of CSK, revealing the crucial role of CSK in sustaining SFK activity and expression. Additionally, CSK deletion led to a substantial downregulation of pro-inflammatory and CLL-supportive cytokines, including TNF- α , CCL3, and IL-1 α .

The fact that the functional readout from the CRISPR/Cas9 screen also identified LYN serves as validation of our previous findings regarding the diminished CLL supportive capacity of LYN knockout macrophages. Here, we additionally show that LYN knockout in THP-1 macrophages resulted in a decreased kinase activity profile, including the reduction of other SFKs. Additionally, LYN-deficient THP-1 macrophages displayed a reduced expression of M1 markers and resistance to M2 polarization, suggesting a more distinct M2 phenotype.

Taken together, the results generated in this thesis provide evidence that the signaling axis governed by LYN and its negative regulator CSK in macrophages leads to the formation of an inflammatory environment, ultimately leading to CLL cell survival.

Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist eine der häufigsten B-Zell-Leukämien in der westlichen Welt. CLL-Zellen sind stark auf ihre Umgebungszellen und lösliche Faktoren angewiesen, die als Tumormikromilieu (TMM) bezeichnet werden. Jüngst wurde die aktive Beteiligung von Tyrosinkinase wie LYN und BTK in TMM-Zellen an der leukämiefördernden Nische nachgewiesen. In einer Lyn-defizienten Umgebung traten Makrophagen als zentrale Akteure hervor, die für das verringerte Fortschreiten der CLL verantwortlich sind. Um den Dialog zwischen Makrophagen und CLL-Zellen in einem vollständig humanen Kontext zu untersuchen, verwendeten wir die monozytische Zelllinie THP-1. Während CLL-Zellen in vitro schnell apoptotisch werden, haben THP-1-Makrophagen das Potenzial, das Überleben von CLL-Zellen in Kultur über Wochen hinweg zu erhalten.

Aufgrund der Bedeutung von Kinasen in der TMM von CLL, zielten wir darauf ab, eine Bibliothek von Tyrosinkinase-Knockout-Makrophagen-Zelllinien zu erstellen, um die möglichen Rollen von Tyrosinkinase im Dialog zwischen CLL und Makrophagen zu untersuchen. Nach einer gründlichen Bewertung aller technischen Parameter, etablierten wir erfolgreich ein funktionales, array-basiertes CRISPR/Cas9-Knockout-Screening aller bekannten Tyrosinkinase in der THP-1 Zelllinie. Einzelgen-Knockout-THP-1-Makrophagen wurden mit CLL-Patientenzellen kokultiviert. Das Überleben der CLL-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen, als Indikator für die unterstützende Kapazität der Knockout-Zellen.

Wir entdeckten dreizehn Tyrosinkinase Knockouts mit konsistent verringerter CLL-Zellüberlebensunterstützung. Interessanterweise wurden in unseren Analysen drei Mitglieder der SRC Kinasefamilie (SFK), darunter LYN, identifiziert. Darüber hinaus wurden zwei negative Regulatoren von SFKs identifiziert, was die Bedeutung der SFK-Signalübertragung im Makrophagen-CLL-Dialog unterstützt. Bemerkenswert ist, dass die Deletion von CSK, dem primären negativen Regulator der SFKs, zu einer robusten Verringerung der CLL-fördernden Kapazität führte. Darüber hinaus wurde die apoptotische Reaktion von CLL-Zellen, induziert durch den BCL-2-Inhibitor Venetoclax, in Kokulturen mit CSK-Knockout-THP-1-Makrophagen im Vergleich zu Kontrollkulturen deutlich verstärkt. Diese Ergebnisse deuten auf einen potenziell synergistischen Effekt der Kombination von CSK-Deletion und BCL-2-Hemmung hin. Überraschenderweise führte die CSK-Deletion in Makrophagen zu einem reduzierten Phosphorylierungsprofil und einer verminderten Expression wichtiger SFKs, einschließlich LYN, in verschiedenen Makrophagen-Zelllinien. Diese Abnahme war abhängig von der Kinaseaktivität von CSK und offenbarte die entscheidende Rolle von CSK bei der Aufrechterhaltung der SFK-Aktivität und -Expression. Zusätzlich führte die CSK-Deletion zu einer erheblichen Herunterregulierung proinflammatorischer und CLL-unterstützender Zytokine, einschließlich TNF- α , CCL3 und IL-1 α .

Die Tatsache, dass das funktionelle Ergebnis des CRISPR/Cas9-Screens auch LYN identifizierte, dient als Bestätigung unserer früheren Erkenntnisse bezüglich der verringerten CLL-unterstützenden Kapazität von LYN-Knockout-Makrophagen. Hier zeigen wir zusätzlich, dass der LYN-Knockout in THP-1-Makrophagen zu einem reduzierten Kinaseaktivitätsprofil führte, einschließlich der Reduktion anderer SFKs. Darüber hinaus zeigten LYN-defiziente THP-1-Makrophagen eine reduzierte Expression von M1-Markern und eine Resistenz gegen die M2-Polarisation, was auf einen ausgeprägteren M2-Phänotyp hinweist.

Zusammengefasst liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse Hinweise darauf, dass die von LYN und seinem negativen Regulator CSK in Makrophagen gesteuerte Signalkaskade zur Bildung einer entzündlichen Umgebung führt, die letztlich das Überleben von CLL-Zellen fördert.