

ABSTRACT

Although kinase inhibitors that target B cell receptor (BCR) signaling are developed for the treatment of B cell malignancies and already in clinical use, it is still incompletely understood, how the activity of these kinases is linked to cell functions with importance for pathogenesis. Therefore, the functional roles of the SRC family kinase LYN that initiates the BCR signaling cascade and of its direct phosphorylation substrate SYK were investigated in this thesis. For this purpose, pharmacological inhibition of LYN or SYK activity by the reversible ATP competitive inhibitors dasatinib and entospletinib, down-regulation of LYN expression via RNA interference and combinations of dasatinib and entospletinib were used. Importantly, dasatinib effects were narrowed down specifically to the inhibition of LYN activity by employing a resistant binding pocket mutant of this kinase, LYN-T319I, in cell line models representing malignant B cells.

In isolated B cells from chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients and in the investigated malignant B cell lines alike, dasatinib and entospletinib efficiently reduced the activating tyrosine phosphorylation of SRC family kinases (SFK) and/or SYK, respectively. In addition, both drugs potently inhibited cytokine secretion, whereas cell survival was only modestly affected. A panel of eight malignant B cell lines was screened for activation of kinases of the BCR pathway and the secretion of CCL3, CCL4 and TNF α in response to triggering the BCR by anti-IgM. The Burkitt's lymphoma cell line RAMOS or CLL-derived OSU-CLL cells showed anti-IgM-induced or constitutive activation of BCR pathway kinases and cytokine secretion, respectively, while the pre-BCR⁺ acute lymphoblastic leukemia cell line NALM-6 failed to produce the mentioned cytokines. In contrast to inhibition of LYN activity by dasatinib, 70 % knockdown of LYN by stable shRNA expression in RAMOS cells did not abrogate anti-IgM induced activating phosphorylation of kinases of the BCR pathway and cytokine release.

LYN-T319I reconstituted the activating auto-phosphorylation of SFK in the presence of 0.1 to 10 μ M dasatinib in NALM-6 and anti-IgM-stimulated RAMOS cells, but only slightly protected the SFK activity in OSU-CLL cells from inhibition by dasatinib. Among downstream signaling molecules of the BCR pathway, the activating phosphorylation of the phosphatase SHP-1 was reconstituted by LYN-T319I more efficiently than that of SYK. Accordingly, phosphorylation of AKT at S473 was not functionally involved in LYN-dependent BCR signaling, while ERK phosphorylation was slightly protected by LYN-T319I.

LYN activity hardly contributed to the survival and metabolic activity of RAMOS and OSU-CLL cells, but LYN-T319I reconstituted the metabolic activity of NALM-6 cells under inhibition by dasatinib. The trans-well migration of NALM-6 cells to CXCL12 was inhibited by dasatinib and reconstituted by LYN-T319I compared to LYN-WT in the presence of 1 μ M dasatinib. The T319I mutation in LYN also rescued the anti-IgM-induced secretion of the cytokines CCL3, CCL4 and TNF α by RAMOS cells from inhibition by dasatinib with largely the same concentration dependence as found for the protection of intracellular SFK activity. Moreover, effects of combined LYN and SYK inhibition on the anti-IgM-induced CCL3 secretion were explored. In the combination of dasatinib and entospletinib the IC₅₀ values for inhibition of CCL3 secretion of the single agents were increased more than 10-fold, corresponding to drug antagonism. This effect was further enhanced in RAMOS cells expressing LYN-T319I in agreement with negative LYN signaling via SHP-1.

Taken together, this study demonstrates that LYN activity hardly affects malignant B cell survival and growth, with the exception of the mentioned contribution of LYN to the metabolic activity of NALM-6 cells, but rather affects cell functions with importance for the microenvironmental dialogue. Here, LYN activity influences chemotaxis of NALM-6 cells to CXCL12 and is strongly connected with the CCL3, CCL4 and TNF α secretion by RAMOS cells.

ZUSAMMENFASSUNG

Der B-Zell-Rezeptor (BZR)-Signalweg stellt einen wichtigen Faktor für die B-Zell-Entwicklung dar und ist damit auch wesentlich an der Pathogenese von B-Zell-Malignitäten beteiligt. Obwohl Kinase-Inhibitoren entwickelt wurden, die gezielt und effizient die BZR-Signaltransduktion hemmen und bereits klinische Anwendung zur Therapie von Leukämien und Lymphomen fanden, sind die exakten Zusammenhänge der entsprechenden Kinase-Aktivitäten mit der für die Pathogenese entscheidenden Zellfunktionen bisher nur unzureichend erforscht.

In der vorliegenden Studie wurden die funktionellen Rollen der SRC-Kinase LYN, welche die BZR Signalkaskade initiiert und ihr direktes Substrat SYK untersucht. Dies erfolgte durch die pharmakologische Hemmung der Aktivität von LYN und SYK durch die reversiblen, ATP-kompetitiven Inhibitoren Dasatinib und Entospletinib einzeln oder kombiniert, sowie die zielgerichtete Abschaltung von *LYN* mittels RNA-Interferenz. Zudem wurde eine Dasatinib-resistente Mutante von LYN (*LYN-T319I*) verwendet, mittels derer Zell-Effekte spezifisch mit der Aktivität von LYN in Zusammenhang gebracht werden konnten.

In primären CLL B-Zellen oder malignen B-Zelllinien reduzierten Dasatinib und Entospletinib effektiv die aktivierende Tyrosin-Phosphorylierung von Src-Familie-Kinasen (SFK) oder SYK. Gleichzeitig hemmten sie wirksam die Sekretion von Zytokinen, wohingegen das Zellüberleben nur mäßig beeinflusst wurde. Im Gegensatz zur Hemmung der LYN-Aktivität durch Dasatinib konnte das posttranskriptionelle *LYN*-Silencing durch RNA-Interferenz die BZR-Signaltransduktion und Zytokin-Sekretion in RAMOS Zellen nicht signifikant verändern.

Während die Anwesenheit der *LYN*-Mutante (*LYN-T319I*), im Vergleich zum Wildtyp in BZR-stimulierbaren RAMOS und NALM-6 Zellen, eine Aufrechterhaltung der intrazellulären Autophosphorylierung der SFKs unter Dasatinib-Behandlung aufwies, konnte diese in OSU-CLL-Zellen, die eine grundlegend aktive BZR-Signaltransduktion aufwiesen, nur teilweise durch *LYN-T319I* geschützt werden. Unter den Molekülen im nachgeschalteten BZR-Signalweg konnte die aktivierende Phosphorylierung der Phosphatase SHP-1, welche der Aktivität von LYN und SYK entgegenwirkt, effektiver durch *LYN-T319I* geschützt werden als die Phosphorylierung von SYK. Entsprechend konnte keine funktionelle Beteiligung der Kinase AKT, welche bekanntlich wesentlich am Zellüberleben beteiligt ist, im LYN-abhängigen Signalweg beobachtet werden. Dabei zeigte sich jedoch im Vergleich zu *LYN*-WT ein Schutz

der ERK-Phosphorylierung in LYN-T319I-produzierenden Zellen. Anschließend wurde die durch die Resistenzmutante wiederhergestellte Aktivität von LYN mit weiteren Funktionen der malignen B-Zelle in Verbindung gebracht. Die Aktivität von LYN beeinflusst das Überleben und Wachstum in den untersuchten malignen Zelllinien kaum, mit Ausnahme des schützenden Beitrags von LYN-T319I zur metabolischen Aktivität in NALM-6-Zellen. Außerdem konnte die Dasatinib induzierte Hemmung der Migration von NALM-6-Zellen zum Chemokin CXCL12 in LYN-T319I-produzierenden Zellen wiederhergestellt werden. Besonders auffällig ist die durch LYN-T319I in anti-IgM-stimulierten RAMOS-Zellen deutlich wiederhergestellte Hemmung der Sekretion von CCL3, CCL4 und TNF α im Vergleich zu LYN-WT unter Behandlung mit Dasatinib. Dabei zeigten sich die Effekte in weitgehend demselben Dasatinib-Konzentrationsbereich wie die erhaltene intrazelluläre SFK-Aktivität. Somit zeigt sich eine funktionelle Beteiligung der LYN-Aktivität zur Sekretion der genannten Zytokine. Überraschenderweise bewirkt die Kombination von Dasatinib mit Entospletinib eine um mehr als 10-fache Erhöhung der IC₅₀-Werte im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Dasatinib, was auf antagonistische Effekte im Hinblick auf die CCL3-Sekretion hindeutet. Dieser Effekt wurde in LYN-T319I-produzierenden RAMOS-Zellen noch deutlich verstärkt, in Übereinstimmung mit nicht kompensierter negativer LYN Signalwirkung über SHP-1.

Abschließend zeigt die vorliegende Arbeit, dass LYN kaum Auswirkungen auf das Überleben und Wachstum von malignen B-Zellen hat, ausgenommen die erwähnte Beteiligung von LYN an der metabolischen Aktivität in NALM-6-Zellen, sondern vielmehr am Dialog mit dem umgebenden Mikromilieu mitwirkt. Dabei weist LYN in NALM-6-Zellen eine Beteiligung an der Migration zu CXCL12 auf und ist stark mit der CCL3, CCL4 und TNF α Ausschüttung durch RAMOS-Zellen verbunden.