

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. M. von Bergwelt

Validierung und funktionelle Charakterisierung  
einer *Cathepsin S* - Gain-of-Function Mutation  
im Follikulären Lymphom

DISSERTATION  
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN  
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON  
SEBASTIAN MAXIMILIAN STOLZ  
AUS MÜNCHEN

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Oliver Weigert
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Ralf Schmidmaier
	Prof. Dr. med. Tobias Feuchtinger
	Prof. Dr. med. Christoph Salat
	Prof. Dr. med. Christina Rieger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. hum. biol. Deepak Bararia
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gundermann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2021

---

*Meiner Mutter*

---

Teile der Publikation „Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma “ sind dieser Arbeit entnommen.\*

---

\*Bararia et al., „Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma.“ *Cell Reports*, 2020 May 5;31(5):107522. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107522. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32330423.

# Validierung und funktionelle Charakterisierung einer *Cathepsin S* - Gain-of-Function Mutation im Follikulären Lymphom

## ZUSAMMENFASSUNG

Das follikuläre Lymphom (FL) ist eines der häufigsten B-Zell-Lymphome. Es zeichnet sich durch eine hohe klinische und genetische Heterogenität aus. Bei fast allen FL ist die IGH/BCL2-Translokation t(14;18) vorhanden, welche aber für das Entstehen der Erkrankung nicht ausreichend ist. Diese Arbeit identifiziert und validiert eine bisher unbekannte rekurrente Hotspot-Mutation in *Cathepsin S* (CTSS). CTSS ist eine Cysteinprotease, welche vor allem im Endolysosom von antigenpräsentierenden Zellen und malignen B-Zellen exprimiert wird. In der untersuchten Stichprobe zeigen 18 von 305 Patienten mit einem FL eine Mutation in CTSS. In 14 der genannten 18 Fälle ist die Position Tyrosin (Y) 132 betroffen, bei 13 der 14 Proben handelt es sich um einen Tausch von Tyrosin zu Aspartat (D). Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die Hotspot-Mutation Y132D, die Mutation M185V und ein Knock-out (KO) von CTSS in Zelllinien mit der Translokation t(14;18) eingefügt. Dabei gelang es, Single-Cell derived Clones der Zelllinie Karpas422 mit dem Knock-in Y132D beziehungsweise M185V zu etablieren. Der CTSS KO erfolgte in Karpas422 und DB-Zellen sowie in der Burkitt-Lymphom Zelllinie DG-75. Der Vergleich der CTSS-Expression in Karpas422 CTSS Y132D zu Karpas422 CTSS Wildtype (WT) zeigte eine signifikante Verschiebung der Ratio von inaktiven CTSS zugunsten von aktiven CTSS in CTSS Y132D. Im nächsten Schritt wurde CTSS Y132D mittels Immunpräzipitation isoliert und in einem *in vitro* Substrate Cleavage Assay mit CTSS WT verglichen. CTSS Y132D besitzt dabei eine zweieinhalb- bis vierfach erhöhte Cleavage Activity im Vergleich zu CTSS WT und stellt damit eine Gain-of-Function Mutation dar.

Da CTSS für seine Rolle in der Prozessierung von MHC-II, BCL2, TLR9 und der Degradierung der extrazellulären Matrix bekannt ist, könnte CTSS Y132D einen funktionellen Einfluss auf die Interaktionen zwischen dem FL und seinem Tumor-Microenvironment ausüben. Der Einfluss der Gain-of-Function Mutation auf die CTSS-Struktur, die autokatalytische Aktivierung von CTSS und die Aktivierung von T-Zellen wurde im weiteren Verlauf von unserer Arbeitsgruppe auf Grundlage des hier etablierten Zelllinienmodells untersucht. Weiterhin wurde die Auswirkung der Gain-of-Function Mutation auf das Progress Free und Overall Survival von Patienten analysiert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Folikuläres Lymphom . . . . .	2
1.1.1	WHO-Klassifikation . . . . .	3
1.1.2	Pathogenese . . . . .	3
1.1.3	Tumormilieu . . . . .	4
1.1.4	Therapie . . . . .	4
1.1.5	Prognose . . . . .	5
1.2	Cathepsin S - Mutationen im follikulären Lymphom . . . . .	6
1.3	Cathepsin S . . . . .	6
1.3.1	Funktion . . . . .	7
1.3.2	Stellenwert von CTSS in der MHC-II-Präsentierung . . . . .	8
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
3.1	Material . . . . .	12
3.1.1	Antikörper . . . . .	12
3.1.2	Chemikalien . . . . .	13
3.1.3	Enzyme . . . . .	13
3.1.4	Kits . . . . .	14
3.1.5	Laborequipment . . . . .	14
3.1.6	Plasmide . . . . .	15
3.1.7	Template-Oligo . . . . .	15
3.1.8	Guide-RNA . . . . .	16
3.1.9	Primer . . . . .	17
3.1.10	Puffer . . . . .	17
3.1.11	Software . . . . .	18
3.1.12	Verbrauchsmaterialien . . . . .	18
3.1.13	Zellen . . . . .	19
3.2	Methoden . . . . .	20
3.2.1	Proteinstudien . . . . .	20
3.2.1.1	Zellyse für Western Blot . . . . .	20
3.2.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	20
3.2.1.3	Proteindenaturierung . . . . .	20
3.2.1.4	Western Blot . . . . .	20
3.2.1.5	Immunpräzipitation . . . . .	21
3.2.1.6	Cleavage Assay . . . . .	21

3.2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	22
3.2.2.1	Zellkultur . . . . .	22
3.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	22
3.2.2.3	Einfrieren von Bakterien . . . . .	22
3.2.2.4	Zellzählung . . . . .	23
3.2.2.5	Elektroporierung . . . . .	23
3.2.2.6	Single Cell Sort . . . . .	23
3.2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	23
3.2.3.1	CRISPR-Cas9 . . . . .	23
3.2.3.2	Klonierung und Transformation der guide-DNA in <i>E. coli</i> . . . . .	24
3.2.3.3	Mini- und Maxiprep . . . . .	25
3.2.3.4	Restriktionsverdau der Plasmide . . . . .	25
3.2.3.5	Screening der CRISPR-Cas9 Klone . . . . .	25
3.2.3.6	RNA-Extraktion . . . . .	27
3.2.3.7	Synthese von cDNA . . . . .	27
3.2.3.8	Extraktion von gDNA . . . . .	28
3.2.3.9	Polymerasekettenreaktion . . . . .	28
3.2.3.10	Sequenzierung . . . . .	28
3.2.3.11	Gelelektrophorese . . . . .	29
3.2.4	Sequenzierdaten . . . . .	29
3.2.5	Statistik . . . . .	29
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
4.1	CTSS Y132D ist eine Hotspot-Mutation . . . . .	30
4.2	Knock-out von CTSS . . . . .	32
4.2.1	Transfektion und Sortierung . . . . .	32
4.2.2	Screening der sortierten Zellen . . . . .	32
4.2.3	Kontrolle der CTSS-Expression . . . . .	33
4.2.4	Bestätigung der Knock-out-Kandidaten . . . . .	34
4.3	Knock-in von Y132D und M185V in CTSS . . . . .	35
4.3.1	Strategie Y132D . . . . .	35
4.3.2	Strategie M185V . . . . .	36
4.3.3	Herstellung der CRISPR-Cas9-Plasmide für Y132D und M185V . . . . .	36
4.3.4	Transfektion und Sortierung . . . . .	37
4.3.5	Screening der sortierten Zellen . . . . .	38
4.3.5.1	Screening für Y132D . . . . .	38
4.3.5.2	Screening für M185V . . . . .	39
4.3.6	Bestätigung der Knock-in-Kandidaten . . . . .	40
4.3.6.1	Verifizierung von Y132D . . . . .	40
4.3.6.2	Verifizierung von M185V . . . . .	41
4.4	Zusammenfassung CRISPR-Cas9 Knock-in und Knock-out . . . . .	42
4.5	Einfluss von CTSS Y132D auf das Zellwachstum . . . . .	43

4.6	Erhöhung des aktiven Anteils von CTSS durch CTSS Y132D . . . . .	44
4.7	Steigerung der proteolytischen Aktivität durch CTSS Y132D . . . . .	45
5	<b>DISKUSSION</b> . . . . .	<b>47</b>
5.1	Überblick über die Hauptergebnisse . . . . .	47
5.1.1	Hotspot-Mutation in CTSS . . . . .	47
5.1.2	Erfolgreicher CTSS Knock-in und Knock-out . . . . .	48
5.1.3	Y132D ist eine Gain-of-Function Mutation . . . . .	49
5.2	Mögliche Auswirkungen abnormaler CTSS-Aktivität . . . . .	51
5.2.1	Intrazelluläre Auswirkungen . . . . .	52
5.2.1.1	Einfluss von CTSS auf MHC-II . . . . .	52
5.2.1.2	Einfluss von CTSS auf die BCL2-Familie . . . . .	53
5.2.1.3	Einfluss von CTSS auf TLR9 . . . . .	54
5.2.2	Extrazelluläre Auswirkungen von CTSS Y132D . . . . .	54
5.2.2.1	CTSS Y132D unter neutralen pH-Bedingungen . . . . .	54
5.2.2.2	Einfluss von CTSS auf den Abbau der extrazellulären Matrix . . . . .	55
5.2.3	CTSS-Inhibitoren . . . . .	55
5.3	Schlussfolgerung . . . . .	56
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> . . . . .	<b>59</b>

# Abkürzungsverzeichnis

**AS** Aminosäuren

**BCL-2** B-cell-Lymphoma 2

**CCL2** Chemokin Ligand 2

**CLIP** Class II-associated Invariant-Chain-Peptide

**CTSS** Cathepsin S

**CRISPR** clustered regularly interspaced short palindromic repeat

**DLI** Donor Lymphocyte Infusion

**EGFR** epidermaler Wachstumsfaktor

**ER** endoplasmatische Retikulum

**FKS** fetales Kälberserum

**FL** folliculäre Lymphom

**FLIPI** Follicular Lymphoma International Prognostic Index

**GFP** green Fluorescent Protein

**gRNA** guide-RNA

**MHC-II** Major Histocompatibility Complex II

**IgH** Immunoglobulin Heavy Chain

**IP** Immunpräzipitation

**KI** Knock-in

**KO** Knock-out

**rpm** Rounds per Minute

**t-Oligo** template-Oligo

**TLR** Toll-like-Rezeptor

**PLB** Passive Lysis Buffer

**WT** Wildtype

# 1

## Einleitung

Eine Grundvoraussetzung des menschlichen Lebens ist die Fähigkeit, Immunzellen in primären und sekundären lymphatischen Organen zu proliferieren und zu differenzieren. Das lymphatische System kann aber auch Ausgangspunkt von Erkrankungen sein. Der Begriff „Lymphom“ ist ein Sammelbegriff für benigne und maligne Vergrößerungen des lymphatischen Systems. In der WHO-Klassifikation von 2016 sind über 70 verschiedene Subtypen von malignen Lymphomen erfasst. Wesentliche Hauptgruppen sind B-Zell-Neoplasien, T-Zell-Neoplasien, NK-Zell-Neoplasien, Hodgkin-Lymphome, dendritische und histiozytäre Neoplasien sowie lymphoproliferative Postransplantationsstörungen.<sup>1</sup> 2014 erkrankten 19 406 Menschen in Deutschland an einem malignen Lymphom, davon 87 % an Non-Hodgkin- und 11 % an Hodgkin-Lymphomen.<sup>2</sup> Klinische Zeichen für ein malignes Lymphom können vergrößerte Lymphknoten, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust sein. Die Sicherung der Diagnose erfolgt morphologisch, immunologisch und zunehmend molekulargenetisch.

Die Stadieneinteilung wird anhand der Ann-Arbor-Klassifikation durch Anamnese, Laboruntersuchung, Sonographie und weiterer Bildgebung vorgenommen.<sup>3, 4</sup>

**Tabelle 1.1:** Ann-Arbor-Klassifikation<sup>3, 4</sup>

<b>Stadium</b>	<b>Beschreibung</b>
I	Involvierung einer einzelnen Lymphknotenregion, lymphoiden Struktur (Milz, Thymus, Waldeyerrachenring) oder eines einzelnen extranodalen Herdes
II	Involvierung von mehr als einer Lymphknotenregion auf einer Seite des Zwerchfells oder Vorliegen eines lokalisierten Befalls eines einzelnen extralymphatischen Organs mit einer regionalen Lymphknotenregion auf einer Seite des Zwerchfells
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells, welcher von einer Beteiligung der Milz, eines extralymphatischen Organes oder beidem begleitet werden kann
IV	Multifokaler Befall von einem oder mehreren extralymphatischen Organen mit oder ohne Lymphknotenbefall
Zusätze	
A	Abwesenheit von B-Symptomen
B	B-Symptomatik
E	Extranodaler Befall
S	Milzbefall

Die Therapie von malignen Lymphomen reicht unter anderem von Watch & Wait über Chemo-, Strahlen-, Immunochemotherapie, allogener Stammzelltransplantation bis hin zu neuen experimentellen Therapiekonzepten. Die Prognose hängt maßgeblich vom Subtyp und dessen genetischen Veränderungen ab.

### 1.1 Follikuläres Lymphom

Zusammen mit dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom ist das folliculäre Lymphom (FL) der am häufigsten vorkommende Subtyp der malignen Lymphome.<sup>5</sup> In Deutschland erkranken pro Jahr

knapp 3000 Patienten, wobei Frauen tendenziell häufiger betroffen sind als Männer.<sup>2</sup>

### 1.1.1 WHO-Klassifikation

Das FL ist eine B-Zell-Neoplasie und als maligne Proliferation von atypischen Zellen des Keimzentrums definiert. Dabei bilden Zentrozyten und Zentroblasten folliculäre Strukturen. Je nach Vorherrschen von malignen unreifen Zentrozyten oder Zentroblasten werden folgende Grade histologisch eingeteilt.<sup>6</sup>

**Tabelle 1.2:** Grading des folliculären Lymphoms<sup>6</sup>

Grad	Beschreibung
1	< 6 Zentroblasten pro Gesichtsfeld
2	6 - 15 Zentroblasten pro Gesichtsfeld
3a	> 15 Zentroblasten pro Gesichtsfeld
3b	Nur Zentroblasten bei fehlenden Zentrozyten im Gesichtsfeld

FL von Grad 1 bis 3a werden als indolent angesehen und zeigen einen weniger malignen Verlauf als 3b-Tumore. Das Risiko einer histologischen Transformation in ein aggressives Lymphom beträgt je nach Therapie 3,6 bis 5,9 % über zehn Jahre.<sup>7</sup> Grad-3b-Tumore ähneln dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und zeigen von Beginn an einen aggressiven Verlauf.<sup>8</sup>

### 1.1.2 Pathogenese

Charakteristisch für das FL ist die große Variabilität an molekularen Veränderungen. Dennoch ist für über 80 % der fortgeschrittenen Fälle die Translokation t(14;18) (BCL2/IGH) kennzeichnend, welche während der V(D)J-Rekombination in der B-Zelle entsteht. Dabei wird die Promoterregion des B-Cell-Lymphoma 2 (BCL2)-Gen auf Chromosom 18 mit der für die Immunglobulin Heavy Chain (IGH) kodierenden Enhancer-Region auf Chromosom 14 fusioniert.<sup>9, 10, 11, 12</sup> Dies führt zu einer Überexpression des antiapoptisch wirkenden Proteins BCL2 und konsekutiv zu einem Überlebensvorteil der mutierten Zelle.<sup>13</sup> BCL2-Translokationen sind auch in B-Zellen gesunder

Kontrollgruppen detektierbar und erhöhen das Erkrankungsrisiko ab einem Schwellenwert von  $> 10^{-4}$  t(14;18)-Kopien in Blutproben um den Faktor 23.<sup>14, 15, 16</sup> Nach aktuellem Forschungsstand ist eine alleinige BCL2-Translokation für die Entstehung eines FL nicht ausreichend. Erst wenn weitere genetische Mutationen erworben werden, kommt es zur Erkrankung.<sup>17, 18</sup> Diese Mutationen können in kodierenden Regionen für epigenetische Regulationsmechanismen, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und anderen Signalmolekülen liegen.<sup>19</sup>

### 1.1.3 Tumormilieu

Als weiterer wichtiger Faktor in der Entwicklung des FL wurde in den letzten Jahren das Microenvironment identifiziert, dass die Interaktion zwischen Tumorzelle und Umgebung beeinflusst. Dieses Microenvironment wird unter anderem von nicht malignen Zellen, wie follikulären T-Helferzellen, regulierenden T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen, Retikulumzellen, follikulären dendritischen Zellen, antigenpräsentierenden Zellen, Stromazellen, Blutgefäßen, der extrazellulären Matrix und weiteren Strukturen gebildet.<sup>18, 20</sup> Veränderungen der Genexpressionssignatur dieser Zellen können dabei prognostisch relevant sein.<sup>21, 22</sup> Ein Teil der Veränderungen betrifft zudem die Signalwege, welche die Immunantwort gegenüber dem FL modulieren. Untersucht sind in B-Zelllymphomen unter anderem Mutationen in der Histon-Acetyltransferase *CREBBP* und der Histon-Methyltransferase *EZH*, welche beide an der Antigen- und MHC-Präsentierung beteiligt sind.<sup>23, 24, 25, 26</sup> Auch Veränderungen am MHC-Molekül selbst, zum Beispiel durch Modifikation von *B2M*, stören die MCH-I-Präsentierung und können dazu führen, dass diese Zellen unter anderem schwieriger von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden.<sup>23, 27</sup>

### 1.1.4 Therapie

Das FL wird meist im Ann-Arbor Stadium III oder IV diagnostiziert und gilt dann als unheilbar.<sup>28</sup> Für Erkrankungen im Stadium I und II wird in kurativer Absicht eine Radiotherapie plus Rituximab-Gabe empfohlen, in speziellen Fällen auch eine Rituximab-Monotherapie oder Watch & Wait. In den fortgeschrittenen Stadien III und IV werden die Symptomatik und die Tumorlast in die Therapieentscheidung miteinbezogen. Nur bei asymptomatischen Patienten mit niedriger Tumorlast kann ein Watch & Wait-Ansatz oder in Ausnahmefällen eine Rituximab-Monotherapie erfolgen.

Bei Patienten mit hoher Tumorlast oder symptomatischer Erkrankung ist eine Kombination aus Rituximab plus Chemotherapie (CHOP, CVP oder Bendamustin) mit gegebenenfalls anschließender Rituximab-Erhaltungstherapie durchzuführen.<sup>29</sup> Die autologe Stammzellretransfusion kommt dahingegen nur für therapierefraktäre Fälle in Frage.<sup>30</sup> Individuelle Risikofaktoren oder molekulare biologische Daten werden aktuell noch nicht standardmäßig in den Therapieempfehlungen berücksichtigt. Durch die Entwicklung und Zulassung von neuen Therapien, wie zum Beispiel weiterentwickelten CD20-Antikörpern, PI3K- oder BTK-Inhibitoren, werden die Therapieempfehlungen aber in Zukunft stärker individualisiert werden.<sup>31, 32, 33</sup>

### 1.1.5 Prognose

Auf Grund der großen Heterogenität des FL ist eine Verlaufsprognose schwierig. In einer retrospektiven Analyse von Tan et al. betrug das mediane Gesamtüberleben 18 Jahre bei einer 10-Jahres-Überlebensrate von 80 %, jedoch ist die individuelle Prognose stark von den molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors abhängig.<sup>34</sup> Einen weiteren wichtigen Risikofaktor stellt die frühe Progression of Disease innerhalb von 24 Monaten nach der Erstlinientherapie (POD24) dar. Patienten der POD24-Gruppe haben ab Progress ein medianes Gesamtüberleben von weniger als 5 Jahren.<sup>35</sup> Um das Risiko für Patienten besser abschätzen zu können, werden Scores wie der Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI), der FLIPI2 und der PRIMA-PI verwendet, welche rein auf klinischen Parametern beruhen.<sup>36, 37, 38</sup> Im Gegensatz dazu integriert der m7-FLIPI zusätzlich genetische Faktoren und teilt die Patienten in eine Niedrig- und Hochrisikogruppe für ein Therapieversagen ein. Grundlage hierfür ist, dass die untersuchten genetischen Mutationen mit einem höheren (*MEF2B*, *ARID1A*, *EZH2*) oder niedrigeren (*EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, *Card11*) Risiko für frühes Therapieversagen assoziiert sind. Zusätzlich werden die klinischen Parameter des FLIPI wie das Alter, die Ann-Arbor-Klassifikation, die Anzahl der betroffenen Lymphknotengebiete, das LDH-Level, das Hämoglobin-Level und der ECOG-Performancestatus in die Berechnung miteinbezogen. In einem Zeitraum von fünf Jahren erlitten 62 % der Patienten der Hoch-Risikogruppe ein Therapieversagen im Gegensatz zur Niedrig-Risikogruppe, in welcher der Anteil nur 23 % betrug.<sup>39</sup>

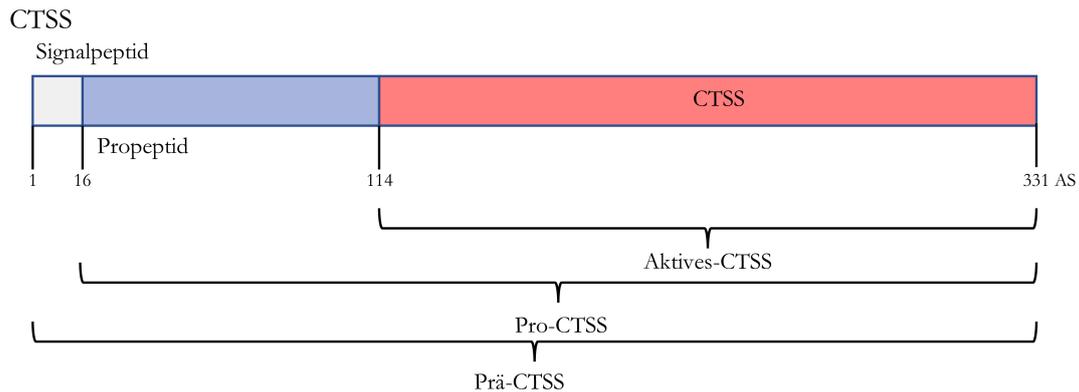
## 1.2 Cathepsin S - Mutationen im folliculären Lymphom

Weigert et al. konnten 2012 am Beispiel eines Donor-derived-FL vertiefte Einblicke in den zeitlichen Ablauf der Mutationsentstehung im FL gewinnen. Im Jahr 1999 erkrankte eine 41-jährige Patientin an einer chronisch myeloischen Leukämie und wurde ein Jahr später mit einer Knochenmarkspende ihrer Schwester (Donor) therapiert. Weiterhin erhielt sie zwei Jahre nach der Knochenmarkspende zusätzlich noch dreimalig Donor Lymphocyte Infusions (DLI). Neun Jahre nach der Transplantation entwickelten beide Schwestern fast simultan ein FL mit identischen Veränderungen in BCL2/IGH, welche bereits in der DLI nachweisbar waren. Dies legt den Schluss nahe, dass spätestens zum Zeitpunkt der DLI eine gemeinsame maligne Vorläuferzelle übertragen wurde. Durch Exomsequenzierung der DLI und der beiden FL wurde festgestellt, dass praktisch alle Shared Mutations der FL bereits in der DLI vorhanden waren, Non-shared Mutations dahingegen nicht. Unter den nachgewiesenen Mutationen fand sich auch eine Mutation in Cathepsin S (CTSS) an der Stelle M185, welche im Donor-FL und den malignen Vorläuferzellen, aber nur zu einem kleinen Anteil im Empfänger-FL, detektierbar war.<sup>40</sup> Bei einer erneuten Analyse der Proben mittels Targeted Hybrid Capture Resequencing wurde in beiden FL zwei unterschiedliche somatische Missense-Mutationen jeweils an der Position Y132 identifiziert, welche nicht in der DLI vorhanden waren und somit unabhängig erworben wurden.<sup>23</sup>

## 1.3 Cathepsin S

CTSS ist eine lysosomale Cysteinprotease, welche überwiegend im Endolysosom von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird und auf Chromosom 1 kodiert ist.<sup>41</sup> Es gehört zu einer Familie von 15 verschiedenen Proteasen (Cathepsin-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -K, -L, -O, -S, -V, -W, und -X), welche sich in ihrer Struktur, ihrem Aktivierungsmechanismus und ihrer Zielstruktur unterscheiden. Ihre Einteilung erfolgt einerseits nach ihrer proteolytischen Aktivität als Aspartat-, Cystein- oder Serinproteasen, andererseits nach ihrem Ansatzpunkt als Endo-, Exo-, oder Endoexo-peptidasen.<sup>42</sup> CTSS wird als 331 Aminosäuren (AS) langes, 37 kDa schweres Präproenzym (prä-CTSS) im endoplasmatischen Retikulum hergestellt. Dabei besteht es aus einem Signalpeptid (16 AS), einem Propeptid (98 AS) und einer aktiven Domäne (217 AS).<sup>43, 44</sup> Das Signalpeptid wird

für den Transport in den Golgi-Apparat benötigt und danach abgetrennt, sodass ein enzymatisch inaktives Proenzym (pro-CTSS) vorliegt. In den Lysosomen wird das Proenzym durch autokatalytische Vorgänge und Prozessierung durch andere Enzyme in seine aktive Form (aktives-CTSS) überführt.<sup>45, 46, 47</sup> CTSS ist unter den Cysteinproteasen einmalig, da es neben seiner Aktivität unter sauren Bedingungen auch unter nicht saurem pH aktiv bleibt.<sup>48, 49, 50</sup>



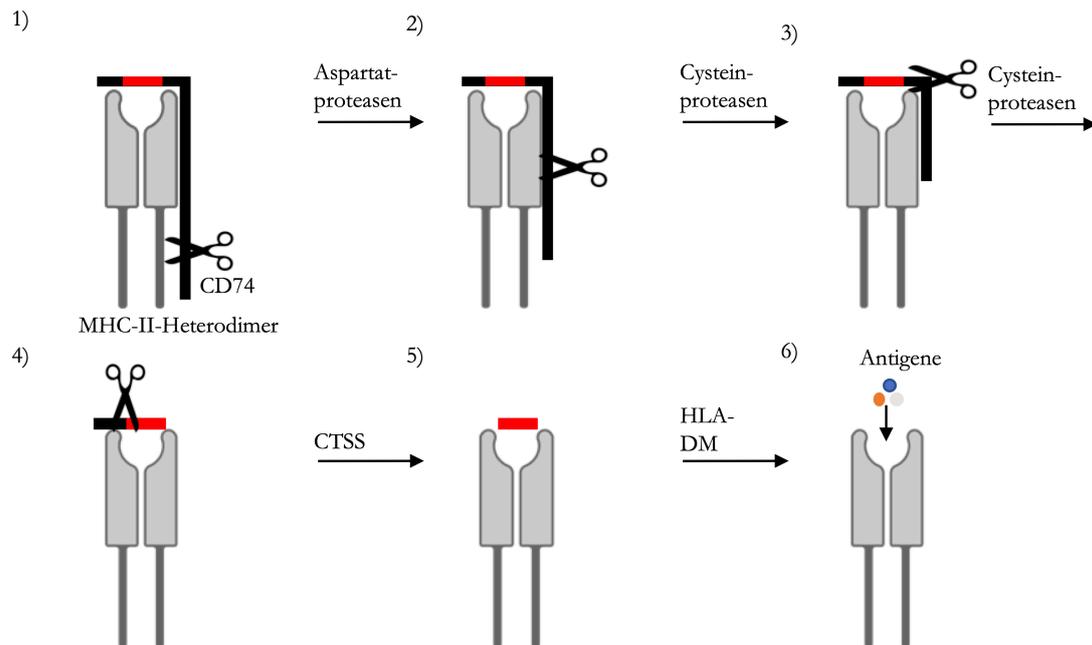
**Abbildung 1.1:** CTSS-Struktur: Das Signalpeptid ist in Grau, das Propeptid in Blau und die aktive CTSS-Form in Rot dargestellt.

### 1.3.1 Funktion

CTSS besitzt eine breite Substratspezifität und ist an verschiedenen intra- und extrazellulären Prozessen beteiligt.<sup>51, 52</sup> Die am besten untersuchte Rolle von CTSS ist die Beteiligung an der MHC-Präsentierung in antigenpräsentierenden Zellen. CTSS ist dabei an der proteolytischen Prozessierung von Antigenen beteiligt und entscheidend für den korrekten Abbau von CD74, welches die MHC-II Bindungsstelle vor frühzeitiger Antigenbindung schützt.<sup>53, 54</sup> Weiterhin spielt CTSS unter anderem eine Rolle bei der Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und der Apoptoseregulation.<sup>55, 56</sup> Im extrazellulären Raum ist CTSS am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt und in dieser Funktion unter anderem Gegenstand aktueller Forschung beim Glioblastom oder Pankreasinselzellkarzinom.<sup>44, 57, 58, 59, 60</sup>

### 1.3.2 Stellenwert von CTSS in der MHC-II-Präsentierung

CTSS ist essentiell für die erfolgreiche Prozessierung des Major Histocompatibility Complex II (MHC-II), da es am Abbau von CD74, auch Invariant Chain genannt, und der Freisetzung von Class II-associated Invariant-Chain-Peptide (CLIP) beteiligt ist.<sup>61</sup>



**Abbildung 1.2:** MHC-II-Prozessierung: Die Antigenbindungsstelle ist durch CD74, welches CLIP (rot) enthält, blockiert, sodass keine Antigenbindung möglich ist (1). Verschiedene Proteasenprozessieren schrittweise CD74 (1-4). CTSS schneidet den N-Terminusanteil von CD74 (4, 5) und hinterlässt CLIP in der Antigenbindungsstelle (5). HLA-DM setzt CLIP frei (5, 6), sodass Antigene an der Bindungsstelle binden können (6).<sup>Nach 62 und 63. Grafikelemente von Biorender.</sup>

Unbeladene MHC-II-Komplexe befinden sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und werden durch CD74, vor einer frühzeitigen Antigenbindung geschützt.<sup>64, 65</sup> Der CD74-Anteil, welcher die Bindungsstelle blockiert, wird als CLIP bezeichnet.<sup>66</sup> Der MHC-II-CD74-Komplex verlässt das ER und fusioniert mit einem Endo-/Lysosom, das Fremdproteine enthält. CD74 ist für den Transport durch die endolysosomalen Kompartimente notwendig und unterliegt dabei einer schrittweisen proteolytischen Spaltung an der luminalen Domäne durch Aspartat- und Cysteinproteasen.<sup>67, 68</sup> Am Ende blockieren nur noch CLIP und ein 9,3 kDa langer N-Terminusanteil die Bindungsstelle. CTSS schneidet sodann den N-Terminusanteil und lässt CLIP in der Antigenbindungsstelle zurück. Die-

ser Prozess kann nur von CTSS und keinem anderen Cathepsin übernommen werden.<sup>53, 69</sup> CLIP wird anschließend unter der Katalysierung von HLA-DM freigesetzt und damit wird die Antigenbindungsstelle freigegeben.<sup>70</sup> Ein Knock-out (KO) von *CTSS* führt zu einer fehlerhaften CD74-Prozessierung und einer Akkumulation von MCH-II-CD74-Komplexen an der Zelloberfläche.<sup>54,\*</sup>

---

\*Als Quelle für die MHC-II-Präsentierung dienen weiterhin die Reviews von Honey et al., 2003 und Sercarz, 2003.

# 2

## Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit beruht auf der bereits einleitend geschilderten Beobachtung, dass zwei Patienten in *CTSS* an der Position Y132 konvergente Mutationen entwickelten. Da dies eine funktionelle Relevanz in der Pathogenese des FL implizieren könnte, wurde daraus die Hypothese dieser Arbeit entwickelt: *CTSS* besitzt an der Position Y132 eine neue, bislang unbekannte Hotspot-Mutation, welche die Aktivität von *CTSS in vitro* beeinflusst. Die Validierung dieser Hypothese ist Gegenstand der hier vorliegenden Promotionsarbeit und resultiert aus folgenden Arbeitsschritten:

1. Rückblickende Analyse der vorliegenden Sequenzierdaten aus der Arbeit von Pastore et al. in Bezug auf Anzahl und Art der Mutationen in *CTSS*.<sup>39</sup>
2. Etablierung einer Strategie, um mit Hilfe von CRISPR-Cas9 die Hotspot-Mutation Y132D, die Mutation M185V und einen Knock-out (KO) von *CTSS* in ein Zelllinienmodell mit der Translokation t(14;18) zu überführen.
3. Isolierung von *CTSS* Wildtype (WT), *CTSS* Y132D und *CTSS* M185V mittels Immunpräzipitation.

4. Vergleich der Expression und der proteolytischen Aktivität von CTSS WT vs. CTSS Y132D vs. CTSS M185V *in vitro*.

Teile dieser Arbeit sind in eine Publikation in *Cell Reports* mit dem Titel „Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma“ eingeflossen.<sup>23</sup>

# 3

## Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Antikörper

**Tabelle 3.1:** Erstantikörper für Western Blot

Antigen	Bestellcode	Spezies	Verdünnung	Hersteller
BCL2	B-3170	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)
CD74	AB181465	Maus	1:2000	Abcam (U.K./ Cambridge)
CTSS	AF 1183	Ziege	1:2000	R&D Systems (USA/ Minneapolis)
ERK	9102	Hase	1:1000	Cell Signaling (USA/ Danvers)
HSP-90	4877S	Hase	1:5000	Cell Signaling Technology (USA/ Danvers)
Mcl1	4572	Hase	1:500	Cell Signaling Technology (USA/ Danvers)
PARP	9542 S/L	Hase	1:500	Cell Signaling Technology (USA/ Danvers)
pERK	43777	Hase	1:1000	Cell Signaling Technology (USA/ Danvers)
TLR9	SAB	Hase	1:2000	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)

**Tabelle 3.2:** Zweitantikörper für Western Blot

Antigen	Bestellcode	Verdünnung	Hersteller
Hase	W4011	1:5000	Promega (USA/ Madison)
Maus	W4021	1:5000	Promega (USA/ Madison)
Ziege	Sc-2020	1:5000	Santa Cruz Biotechnology (USA/ Dallas)

### 3.1.2 Chemikalien

**Tabelle 3.3:** Chemikalien

Name	Hersteller
2-Isopropanol	Carl Roth (GE/ Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)
Acrylamid	Carl Roth (GE/ Karlsruhe)
Agarose	Promega (USA/ Madison)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)
Ethanol	Merck (GE/ Darmstadt)
LB-Agar	Carl Roth (GE/ Karlsruhe)
Methanol	Merck (GE/ Darmstadt)
Milchpuder	Carl Roth (GE/ Karlsruhe)
Protein Assay Dye Reagenz	Biorad (USA/ Hercules)
Roti-GelStain	Carl Roth (GE/ Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat	Biorad (USA/ Hercules)
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)
Tween 20	Carl Roth (GE/ Karlsruhe)

### 3.1.3 Enzyme

**Tabelle 3.4:** Enzyme

Name	Schnittstelle	Hersteller
AciI	5' C↓CGC 3' 3' GGC↑G 5'	New England Biolabs (UK/ Ipswich)
DpnII	5' ↓ATC 3' 3' CTAG↑ 5'	New England Biolabs (UK/ Ipswich)
KpnI	5' GGTAC↓C 3' 3' C↑CATGG 5'	New England Biolabs (UK/ Ipswich)

Bpil (BbsI) 5' GAAGACN<sub>2</sub> ↓3'  
3' CTTCTGN<sub>6</sub> ↑5'

Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)

### 3.1.4 Kits

**Tabelle 3.5:** Kits

Name	Hersteller
Cathepsin S Fluorometric Assay Kit	BioVision (USA/ San Francisco)
Pierce 660nm Protein Assay Kit	ThermoFisher (USA/ Waltham)
DNA Blood Mini Kit	Qiagen (GE/ Hilden)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck, Millipore (GE/ Darmstadt)
Primary Cell Nucleofector Kits for Nucleofector II	Lonza (SUI/ Basel)
PureLink RNA Mini Kit	LifeSciences (USA/ Irvine)
PureYield Plasmid Miniprep System	Promega (USA/ Madison)
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega (USA/ Madison)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (GE/ Hilden)
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen (USA/ Carlsbad)

### 3.1.5 Laborequipment

**Tabelle 3.6:** Laborequipment

Name	Zusammensetzung
Analysenwaage ABJ-NM	Kern & Sohn (GE/ Balingen)
Varioclav	HP Labortechnik (GE/ München)
BD Aria II	BD Biosciences (USA/ Franklin Lakes)
Blockthermostat BT 1302-hlc	Biotech (GE/ Bovenden)
Centrifuge 5424 R	Eppendorf (GE/ Hamburg)
Crusheisbereiter - Ice Maker FM-AKE-SB	Hoshizaki (JPN/ Nagoya)
Ebox VX5	Vilber (GE/ Eberhardzell)
Fusion XPress SL7 Spectra	Vilber (GE/ Eberhardzell)
Gefrierschrank (-20° C) - KTR 1544	Bosch (GE/ Gerlingen)
Gefrierschrank (-80° C) - HERAFreeze HFU B	ThermoFisher (USA/ Waltham)
GloMax Discover	Promega (USA/ Madison)
Heraeus Megage 40 Universalzentrifuge	ThermoFisher (USA/ Waltham)
Inkubationsschüttler - Multitron II	Infors HT (SUI/ Bottmingen)
Inkubator Modell CB 160	Binder (GE/ Tuttlingen)
Kühlschrank (4° C) - GSL 11430	Bosch (GE/ Gerlingen)
Labogaz 206	Campingaz (GE/ Hungen-Inheiden)

**Tabelle 3.6:** Laborequipment

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Mikrowelle	Siemens (GE/ München)
Millipore Q-Pod	MerckMillipore (DE/ Darmstadt)
Mini Horizontal Gel System - PerfectBlue Gel System Mini L	VWR (GE/ Erlangen)
Mr. Frosty Freezing Container	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)
Nanodrop 1000	VWR (GE/ Erlangen)
Pipetten	Eppendorf (GE/ Hamburg)
Pipetus	Hirschmann (GE/ Eberstadt)
Power Pac 300	Biorad (USA/ Hercules)
Roller - RS-TR-05	Phoenix Instrument (GE/ Garbsen)
Sicherheitswerkbank FlowSafe B-130	Berner (GE/ Elmshorn)
Stickstoffbehälter	Messer (GE/ Bad Soden am Taunus)
Thermocycler peqSTAR 2x Universal	VWR (GE/ Erlangen)
Tischzentrifuge Sprout	Biozym (AUT/ Wien)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (GE/ Bohemia)
Wasserbad Typ 1003	GFL (GE/ Burgwedel)
Zellzähler Vi-CELL XR	Beckmann Coulter (USA/ Brea)

### 3.1.6 Plasmide

**Tabelle 3.7:** Plasmide

<b>Name</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herkunft</b>
pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	CRISPR-Cas9 Backbone	Zhang Lab (USA/ Boston)
Cas9_CTSS-M185V	Für M185V Knockin	Diese Arbeit (GE/ München)
Cas9_CTSS-Y132D	Für Y132D Knockin	Diese Arbeit (GE/ München)
Cas9_CTSS-KO	Für CTSS Knockout	AG Bultmann (GE/ München)

Das pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) kann von Feng Zhang bezogen werden (Addgene plasmid 48138; <http://n2t.net/addgene:48138> ; RRID:Addgene\_48138).

### 3.1.7 Template-Oligo

Der template-Oligo (t-Oligo) wird benötigt, um beim Knock-in (KI)-Experiment der Zelle eine Korrekturvorgabe vorzugeben.

**Tabelle 3.8:** Sequenzen der t-Oligos

Name	Sequenz 5' - 3'
Y132D	agccagtggcagagaaatcacatataagtcaaaccctaatcggatattgcctgattctgtggactggagagagaaaggggtgtgtt actgagtgaaaGatcaagtgagtattaccatccaagcgtctgaaccctaggtagagctctttaatgcttagtctagctacagaat ttgacagtgaatcttacagtcccac
M185V	gctgaagctgaaaacaggaagctgggtctctcagtgccagaacctgggtgattgctcaactgaaaaatgtcttaagcaaactttt tgtgatggaacaaggctgcaatggCggcttcGtgacaacTgctttccagtacatcattgataacaagggcacgactcagacg cttcctatccctacaagccatgggtgc

Großgeschrieben sind Veränderungen, welche im Vergleich zur WT CTSS-Basensequenz vorgenommen wurden, um den KI durchzuführen, eine Restriktionsenzymchnittstelle zu schaffen oder um die Bindspezifität zu erhöhen.

### 3.1.8 Guide-RNA

Die guide-DNA wird benötigt, um den CRISPR-Cas9-Komplex zur gewünschten Lokalisation des Doppelstrangbruches zu navigieren. Dabei muss beachtet werden, dass die hier verwendete Cas9 ein 5-NGG-Protospacer Adjacent-Motif in der Zielsequenz zur Bindung benötigt.<sup>71</sup>

**Tabelle 3.9:** Guide-RNA für Y132D und M185V

Name	Sequenz 5' - 3' (Annealingtemperatur)
CTSS_M185V_gRNA_FWD	CACCGCAATGGTGGCTTCATGACAA (95°C)
CTSS_M185V_gRNA_REV	aaacTTGTCATGAAGCCACCATTTGC (95°C)
CTSS_Y132D_gRNA_FWD	CACCGAGCTCTACCTAGGGTTCAG (95°C)
CTSS_Y132D_gRNA_REV	aaacCTGAACCCTAGGTAGAGCTC (95°C)
CTSS_KO_gRNA_FWD	CACCGTACCTACCATGTCTCCCAGG (95°C)
CTSS_KO_gRNA_REV	TTCTGTACACGTTCTTACGTCCTT (95°C)

### 3.1.9 Primer

**Tabelle 3.10:** Primer

Name	Sequenz 5' - 3' (Annealingtemperatur)
CTSS_M185V_scr-cDNA_FWD	GTTCCTTGTGGTGCTTGCTGGG (56,3°C)
CTSS_M185V_scr-cDNA_REV	GACATTTCTGATCCATGGCTTTGTAGG (58,2°C)
CTSS_M185V_scr-gDNA_FWD	GGTTCTTGTGGTGCTTGCTG (56,43°C)
CTSS_M185V_scr-gDNA_REV	CCAGCACAGTCAGTCAGTGG (57,04°C)
CTSS_Y132D_scr-cDNA_FWD	CTGAGAGTTCCCAGCCAGTG (55,9°C)
CTSS_Y132D_scr-cDNA_REV	CAGGTTCTGGGCACTGAGAG (55,9°C)
CTSS_Y132D_scr-gDNA_FWD	GATGAGTTCCCTGAGAGTTCCC (55,96°C)
CTSS_Y132D_scr-gDNA_REV	ACACGTGGGACTGTAAGATTC (53,99°C)
GAPDH_ex9&ex10_cDNA_FWD	CACCCACTCCTCCACCTTTG (55,9°C)
GAPDH_ex9&ex10_cDNA_REV	TCTCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTG (57,7°C)

### 3.1.10 Puffer

**Tabelle 3.11:** Puffer

Name	Zusammensetzung
1,2% Agarosegel	200 ml: 2,4 g Agarose, ad 1x TBE
Running Buffer Western Blot	1 l: 1x NuPage Running Buffer, ad Aqua dest.
TBS	1 l: TBS 1x, 0,1% Tween 20
TBST	1 l: 2,41 g Tris, 17,53 g NaCl, ad Aqua dest.
Transferbuffer Western Blot	0,5 l: 25 ml NuPage Transfer Buffer, 500 µl Bolt Antioxidant, 50 ml Methanol, ad Aqua dest.
Western Blot Sammelgel 12%	15 ml: 6,5 ml Aqua dest., 4,5 ml 40% acrylamide mix, 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,15 ml 10% SDS, 0,15 ml 10% Ammoniumpersulfat, 0,006 ml TEMED
Western Blot Trenngel 5%	6 ml: 4,6 ml Aqua dest., 0,7 ml 40% Acrylamidmix, 0,5 ml 5 M Tris (pH 6,8), 0,06 ml 10% SDS, 0,06 ml 10% Ammoniumpersulfat, 0,006 ml TEMED

### 3.1.11 Software

**Tabelle 3.12:** Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
4Peaks	Nucleobytes (NE/ Aalsmeer)
Adobe Creative Suite 6	Adobe (USA/ San José)
Benchling 2019	Benchling (USA/ San Francisco)
Abrufbar unter: <a href="https://benchling.com">https://benchling.com</a> .	
Biorender 2019	Biorender (CAN/ Toronto)
Abrufbar unter: <a href="https://biorender.com">https://biorender.com</a> .	
ImageJ 2019	Rüden et al. <sup>72</sup>
Cosmic 3D	Sanger-Institut (UK/ Hingston)
LaTeX	Diese Doktorarbeit wurde mit LaTeX geschrieben, entwickelt von Leslie Lamport basierend auf Donald Knuths Tex. Die in dieser Arbeit verwendete Formatvorlage wurde von J. Suchow online ( <a href="https://github.com/suchow/Dissertate">github.com/suchow/Dissertate</a> ) veröffentlicht
Microsoft Office 2007/ 2016	Microsoft (USA/ Redmond)
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research (USA/ Cambridge)
Prism 6	Graphpad Software (USA/ La Jolla)
SerialCloner 2.6	Frank Perez
Texmaker 5	Pascal Brachet

### 3.1.12 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.13:** Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
0,2 ml PCR Tube Strips	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Ambion Nuclease Free Water	Life Technologies (USA/ Carlsbad)
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (UK/ Little Chalfont)
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (UK/ Little Chalfont)
Amersham Hybond P 0.45 PVDF	GE Healthcare (UK/ Little Chalfont)
Antibiotisch-Antimykotisch (100x)	ThermoFisher (USA/ Waltham)
Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 10-well	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Complete M Lysis Buffer	Roche (SUI/ Basel)
Costar 5/ 10/ 25 mL serologische Pipetten	Coring (USA/ Corning)

CryoPure Tube	Sarstedt (GE/ Nürnberg)
DMEM	Biochrom (GE/ Berlin)
DNA Loading Dye 6x	ThermoFisher (USA/ Waltham)
Falcon 15/ 50 ml	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Falcon 5ml Rundboden polystyren	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Fetales Kälberserum	Biochrom (GE/ Berlin)
Magic Marker	Invitrogen (USA/ Carlsbad)
NuPage Bolt Sample Reducing Agent (10x)	ThermoFisher (USA/ Waltham)
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	ThermoFisher (USA/ Waltham)
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	ThermoFisher (USA/ Waltham)
NuPage Running Buffer	ThermoFisher (USA/ Waltham)
NuPage Transfer Buffer (20x)	ThermoFisher (USA/ Waltham)
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Passive Lysis Buffer (5X)	Promega (USA/ Madison)
PBS	Pan Biotech (GE/ Aidenbach)
Pre diluted Protein Assay Standard	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Quick Load 2log DNA Ladder	New England Biolabs (UK/ Ipswich)
Quick Load purple 50 bp Ladder	New England Biolabs (UK/ Ipswich)
RPMI-1640	Biochrom (GE/ Berlin)
Safe-Lock Tubes	Eppendorf (GE/ Hamburg)
SeeBlue2 Plus	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Semperguard Nitril Einweg-Handschuhe	Sempermed (AUS/ Wien)
TC-Flasche T25/ T75/ T125	Sarstedt (GE/ Nürnberg)
TC-Platte 6/ 12/ 24/ 48/ 96	Sarstedt (GE/ Nürnberg)
TipOne Pipettenspitzen	Starlab (GE/ Hamburg)
TRIzol Reagent	Thermo Fisher Scientific (USA/ Waltham)
Whatman Gel Plotting Papier GB003	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)

### 3.1.13 Zellen

Tabelle 3.14: Zellen

Name	Hersteller
HEK293t	ATCC CRL11268 (USA/ Manasas)
DB	ATCC CRL2289 (USA/ Manasas)
DG 75	ATCC CRL2625 (USA/ Manasas)
Karpas422	Sigma-Aldrich (USA/ St. Louis)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Proteinstudien

#### 3.2.1.1 Zellyse für Western Blot

Zur Lyse wurden Zellen in 4°C kühlem PBS gewaschen, mit Complete Lysis Buffer M von Roche inklusive Phosphatase-Inhibitor 2-3 versetzt und 15 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Lysate bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

#### 3.2.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Die Lysate wurden dazu im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und mit BioRad-Dye-Reagenz versetzt. Die Standardkurve wurde mit den Beispielproteinen des Pierce 660 nm Protein Assay Kit pipettiert und die Absorption im GloMax bei 595 nm nach 15-minütiger Inkubation im Dunklen gemessen.

#### 3.2.1.3 Proteindenaturierung

Die berechnete Proteinmenge (3.2.1.2) wurde mit dem NuPage LDS Sample-Buffer und dem NuPage Reducing-Agent nach Herstellerangaben versetzt und auf 30 µl pipettiert. Anschließend erfolgte eine zehnmütige Inkubation bei 72°C im Heizblock.

#### 3.2.1.4 Western Blot

Zur Trennung der Proteine wurden selbst hergestellte Gele (Tabelle 3.11) oder bei größeren Volumina vorgefertigte Gele von ThermoScientific Fisher verwendet. Für die Darstellung von CTSS wurde eine Spannung von 120 Volt für 60 Minuten angelegt, für andere Proteine ergaben sich teils längere, teils kürzere Zeiten. Der Proteintransfer wurde auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran bei 20 Volt für 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in 5%iger-TBST-Milch geblockt, mit dem Erstantikörper über Nacht und dem Zweitantikörper für eine Stunde versetzt. Zwischen und nach den Inkubationen wurde die Membran jeweils dreimal zehn Minuten mit 5%igem-TBST gewaschen. Die Membran wurde für drei Minuten in der ECL Western Blot

Reagenz inkubiert und die Bilder mit Hilfe des digitalen Geldokumentationssystems Fusion aufgenommen.

### 3.2.1.5 Immunpräzipitation

Zur CTSS-Anreicherung wurden  $30 \times 10^6$  Zellen in 4°C PBS gewaschen, mit 200 µl 4°C Passive Lysis Buffer (PLB) versetzt und 15 Minuten bei leichtem Schütteln auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Lysat 30 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Proteinkonzentration (3.2.1.2) bestimmt und 600 µg Protein auf 1 ml 0,5x PLB pipettiert. Für die erste Immunpräzipitation (IP) wurden G-Beads und 2 µg IgG-Goat-Antikörper hinzugegeben, um unspezifische Bindungen im zweiten IP-Schritt zu vermeiden. Das Gemisch wurde sodann im Kühlschrank für eine Stunde inkubiert und anschließend mit 2000 g zentrifugiert. Der Überstand dieser ersten IP wurde mit frischen Protein G-Beads plus 2 µg CTSS Antikörper versetzt und 3 Stunden im Kühlraum inkubiert. Abschließend wurde das IP-Produkt 3 Mal in 0,5x PLB gewaschen und in 200 µl 0,5x PLB resuspendiert.

### 3.2.1.6 Cleavage Assay

Die Messung der CTSS-Aktivität erfolgte mittels eines modifizierten Fluoreszenzassays von BioVision. Das Reaktionsgemisch für den Versuch wurde auf Eis in einem abgedunkelten Raum pipettiert.

**Tabelle 3.15:** Reaktionsgemisch für Cathepsin S-Aktivitätsassay

Menge	Produkt
15 µl	IP-Produkt nach 3.2.1.5
35 µl	PLB
50 µl	Reaktionspuffer
2 µl	VVR-Substrat

Das VVR (Valin-Valin-Arginin)-Substrat besitzt einen AMC (Amino-4 Trifluoromethyl Coumarin)-AFC (Aminofluorocoumarin)-Tag, welcher freigesetzt wird, sobald VVR-AMC durch CTSS ge-

schnitten wird. Die Menge an freigesetztem AMC spiegelt die proteolytische Aktivität von CTSS wider und kann bei einer Extinktion von 400 nm und einer Emission von 505 nm in einem Lumineszenzmessgerät bestimmt werden. Um zu überprüfen, ob pro CTSS-Probe die gleiche Menge an CTSS geladen wurde, wurden jeweils 15 µl der Probe in einem Western Blot quantifiziert. Da die leichte Kette des IP-CTSS-Antikörpers mit 25 kDa auf einer ähnlichen Höhe wie aktives CTSS (24 kDa) liegt, wurde sowohl ein regulärer, als auch ein HRP-Antikörper, welcher nur an intaktes IgG bindet, verwendet.

### 3.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in RPMI-1640 oder DMEM mit einem 10 %-Anteil an fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Je nach Zelllinie wurde beim Splitten eine Zelldichte von  $0,2 - 0,5 \times 10^6$  Zellen pro ml angestrebt. Das Nährmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Der CO<sup>2</sup>-Anteil des Inkubators betrug 5 %, die Temperatur 37°C und die relative Luftfeuchtigkeit 95 %.

#### 3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor der Zugabe des Einfriermediums, welches aus 10 % DMSO und 90 % FKS bestand, wurden  $10 \times 10^6$  Zellen abgezählt und in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Kühlung der Zellen für drei Tage bei -80°C, um abschließend im Stickstofftank bei -200°C gelagert zu werden.

Aufgetaut wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden einmal in vorgewärmten Medium gewaschen und anschließend kultiviert.

#### 3.2.2.3 Einfrieren von Bakterien

600 µl einer angezüchteten Bakterienkolonie wurden mit 600 µl Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.2.4 Zellzählung

Die Zellzahl und Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe des Vi-Cells berechnet. Dazu wurden 0,5 - 1 ml Zellen in ein Zellszählgefäß gegeben und mittels automatischer Bilderkennung gezählt.

#### 3.2.2.5 Elektroporierung

Die Elektroporierung erfolgte mit dem Nucleofector II Kit von Lonza. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen zweimal in PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l Solution V suspendiert und in die dafür vorhergesehene Kuvette pipettiert. Zusätzlich wurden 2  $\mu$ g des jeweiligen Plasmids (Tabelle 3.7) und bei den KI Experimenten 4  $\mu$ g eines t-Oligos (Tabelle 3.8) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Programm X-01 elektroporiert, mit 0,25 ml RPMI-1640 und 0,25 ml FKS versetzt und das gesamte Volumen aus der Kuvette in eine 24-Well-Platte mit 0,5 ml RPMI-1640 und 0,5 ml FKS gegeben. Abschließend wurden die Zellen 48 Stunden bis zum Single Cell Sort inkubiert.

#### 3.2.2.6 Single Cell Sort

Das pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Plasmid enthält eine 2A-EGFP-Markierung, welche bei erfolgreicher Elektroporation transient durch die Zelle exprimiert wird. 48 Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen mit der höchsten GFP (green fluorescent protein)-Expression als Einzellzellen in eine 96-Well-Platte mit 160  $\mu$ l RPMI-1640, 40  $\mu$ l FKS und einer antibiotisch-antimykotischen Lösung sortiert. Je Versuch wurden zehn 96-Well-Platten hergestellt. Abschließend wurden die Zellen drei Wochen bis zum Screening (3.2.3.5) inkubiert.

### 3.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 ist ein Komplex, welcher ursprünglich als Abwehrsystem gegen Phagen in Bakterien entdeckt wurde.<sup>73</sup> Dabei erkennt der CRISPR-Cas9-Komplex eine palindromische Sequenz und schneidet diese. Durch gezielte Manipulation kann der Komplex dazu genutzt werden, einen Doppelstrangbruch in Prokaryonten oder Eukaryonten zu erzeugen.<sup>74</sup> Somit wird es möglich, das Genom präzise zu bearbeiten.<sup>71, 75</sup> Zur Identifizierung der Zielsequenz dient eine guide-DNA, welche

in ein Plasmid mit CRISPR-Cas9 eingefügt wird. Das in dieser Arbeit verwendete pSpCas9(BB)-2A-GFP-Plasmid besitzt Cas9 von *S. pyogenes*, einen GFP-Tag, eine Ampicillin-Resistenz und ist synthetisch hergestellt.

### 3.2.3.2 Klonierung und Transformation der guide-DNA in *E. coli*

Zuerst wurden die guide-DNA-Stränge (Tabelle 3.9) zusammengefügt und bei 95°C für 5 Minuten im Heizblock inkubiert.

**Tabelle 3.16:** Guide-DNA Annealing nach Ran<sup>71</sup>

Substanz	Volumen
sgRNA-FWD (Tabelle: 3.9) (100 µM)	20 µ
sgRNA-REV (Tabelle: 3.9) (100 µM)	20 µ
T4 ligation buffer	5 µ
ddH <sub>2</sub> O	5 µ

Im nächsten Schritt wurde die guide-DNA in das pSpCas9-Plasmid kloniert und mittels PCR amplifiziert.

**Tabelle 3.17:** Klonierung modifiziert nach Ran<sup>71</sup>

Substanz	Menge
pSpCas9 (BB)	40 fmol
Annealed gRNA Fragment	120 fmol
Fast Digest BpiI (ThermoFisher)	1 µl
T4 Ligase (30 U)	1 µl
T4 Ligase Buffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl

**Tabelle 3.18:** PCR-Klonierung nach Ran<sup>71</sup>

Zyklusnummer	Konditionen
1 - 54	37°C für 5 min, 20°C für 5 min
55	37°C für 60 min
56	65°C für 10 min

Das Plasmid wurde in *E. coli* nach dem OneShot-Protokoll transformiert und auf einer Ampicillin Agarplatte ausgesät. Anschließend wurden je Plasmid zwölf Kolonien ausgewählt und in LB-Medium über Nacht im Bakterieninkubator inkubiert.

### 3.2.3.3 Mini- und Maxiprep

Die Bakterienkultur wurde mit dem PureYield Plasmid Miniprep System verarbeitet und in 30 µl Elutionspuffer gelöst. Nach Messung der DNA-Konzentration und Kontrolle der Plasmide (3.2.3.4) wurden je Plasmid vier Kolonien für einen Maxiprep ausgewählt. Dieser Prozessschritt erfolgte mittels des Pure Yield Plasmid Maxiprep Systems nach Herstellerangaben.

### 3.2.3.4 Restriktionsverdau der Plasmide

Zur Kontrolle, ob die Transformation (3.2.3.2) erfolgreich war, wurde ein Doppelverdau mit BbsI und KpnI durchgeführt. Dabei zeigt ein erfolgreicher Einbau der guide-RNA in den Backbone nur eine Bande im Agarosegel, da durch die Insertion die BbsI-Sequenz zerstört wird. Bei einem fehlgeschlagenen Einbau wird die BbsI-Sequenz nicht zerstört und es sind zwei Fragmente sichtbar.

### 3.2.3.5 Screening der CRISPR-Cas9 Klone

Um die Klone nach dem Single Cell Sort auf den erfolgreichen KI oder KO hin zu untersuchen, wurde das „Protocol for Rapid and Versatile Genome Engineering Using The MIN (Multifunctional Integrase) Strategy“ des Departments Biologie für Human Biology & Bioimaging der LMU benutzt.<sup>76</sup>

Im ersten Schritt wurden dazu die inkubierten Klone, welche sich in 96-Well-Platten befanden, gesplittet, eine Hälfte in Kultur behalten und von der anderen Hälfte die gDNA extrahiert.

**Tabelle 3.19:** Herstellung des Lysepuffers nach LMU-Protokoll<sup>76</sup>

Substanz	Volumen
1x PCR Buffer (500 mM Tris, 100 mM CaCl <sub>2</sub> )	5 µl
Proteinase K (50 µg/ml)	0,25 µl
1.7 µM SDS	0,05 µl
H <sub>2</sub> O	44,7 µl

Im nächsten Schritt wurden die DNA der lysierten Klone mit den Screeningprimern (Tabelle 3.10) vervielfältigt.

**Tabelle 3.20:** Herstellung des PCR-Mixes nach LMU-Protokoll<sup>76</sup>

Substanz	Volumen
Forward Screening Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Screening Primer (10 µM)	1 µl
5x MyTaq Buffer	5 µl
MyTaq	0,1 µl
H <sub>2</sub> O	15,4 µl

**Tabelle 3.21:** PCR-Zyklen nach LMU-Protokoll<sup>76</sup>

Zyklusnummer	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95°C, 300 s		
2 - 45	95°C, 30 s	60°C, 30s	72°C, 30s
46			72°C, 40 s

Für das folgende Screening der KO-Klone wurde das PCR-Produkt der zu untersuchenden Klone in ein Agarosegel geladen und auf Abweichungen von der CTSS WT-Produktgröße kontrolliert. Klone, welche von der CTSS WT-Größe abweichen, waren positiv im PCR-Screening und wurden für die weitere Verifizierung mittels Westernblot und Sanger-Sequenzierung ausgewählt.

Bei den KI-Klonen führt ein erfolgreicher KI nicht zu einer Veränderung der Produktgröße, da die Basenpaaranzahl sich nicht von der des CTSS WT unterscheidet. Daher wurden 10 µl des PCR-Produkts in ein Agarosegel geladen und die restlichen 7,5 µl für den Digest verwendet.

**Tabelle 3.22:** Herstellung des Digest-Mixes nach LMU-Protokoll<sup>76</sup>

<b>Substanz</b>	<b>Volumen</b>
10x FastDigest Buffer Green (Thermo)	1 µl
AciI oder DpnII	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	11 µl

Anschließend wurde das PCR-Agarosegel mit dem Digest-Agarosegel verglichen. Da bei erfolgreich veränderten Klonen der Einbau einer Restriktionsenzymchnittstelle erfolgte, können diese mit dem passenden Enzym (Tabelle 3.4) erfolgreich verdaut werden und zeigen im Digest-Gel andere Produktgrößen als im PCR-Gel.

### 3.2.3.6 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte gemäß der Single-Step-Methode mit TRIzol nach Herstellerangaben. Die RNA-Konzentration wurde photospektrometrisch mit dem Nanodrop1000 bestimmt.

### 3.2.3.7 Synthese von cDNA

Die cDNA Synthese wurde aus der isolierten RNA (3.2.3.6) mit der SuperScript II reversen Transkriptase nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.3.8 Extraktion von gDNA

Die genomische DNA wurde aus  $5 \times 10^6$  Zellen mittels des DNA Blood Mini Kits extrahiert und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm auf dem Nanodrop1000 gemessen.

### 3.2.3.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit der Polymerase KOD durchgeführt. Für KOD kam dabei folgendes Step-Down Protokoll zum Einsatz.

**Tabelle 3.23:** Step-Down Protokoll

Zyklusnummer	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95°C, 120 s		
2 - 4	95°C, 30 s	74°C, 40s	68°C, 40s
5 - 7	95°C, 30 s	70°C, 40s	68°C, 40s
8 - 10	95°C, 30 s	68°C, 40s	68°C, 40s
11 - 13	95°C, 30 s	70°C, 40s	68°C, 40s
14 - 16	95°C, 30 s	66°C, 40s	68°C, 40s
17 - 19	95°C, 30 s	62°C, 40s	68°C, 40s
20 - 22	95°C, 30 s	58°C, 40s	68°C, 40s
23 - 47	95°C, 30 s	54°C, 40s	68°C, 40s
48			68°C, 300s

Für das Screening der KI-Zellen wurde die Polymerase Bioline MyTaq (Tabelle 3.21) benutzt.

### 3.2.3.10 Sequenzierung

Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden bei GATC-Biotech sequenziert. Dazu wurden 80-100 ng aufgereinigte DNA mit 5  $\mu$ M Primer auf 10  $\mu$ l Gesamtvolumen pipettiert.

### 3.2.3.11 Gelelektrophorese

Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch Gelelektrophorese in einem 1,2 - 1,5 %-TBE-Agarosegel mit 1x Roti-Gel-Stain bestimmt. Die DNA wurde mit einer Loading-Dye gemischt und in das mit 1x TBE-Puffer bedecktem Gel geladen. Als Größenmarkierung diente eine 50 beziehungsweise 100-Basenpaare Markierung. Anschließend wurde eine Spannung von 140 Volt für 45 Minuten angelegt. Die Auswertung erfolgte mit dem digitalen System Ebox VX5.

### 3.2.4 Sequenzierdaten

Die in Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Patientenproben wurden im Rahmen der Publikation von Pastore et al. 2015 sequenziert.<sup>39</sup> Diese Sequenzierdaten bilden die Grundlage der Auswertung im Ergebnisteil. Gewertet wurden nicht-silente Mutationen in *CTSS* mit einer Variant Allele Frequency von  $\geq 10\%$ . \* Die Sequenzierdaten sind auf Mendeley-Data (DOI 10.17632/pr5cfx8mnh.1) unter Figure 1 - *VarCall\_FLonly\_PLG&HemoSeq\_2014 10 28.xlsx* zugänglich.

### 3.2.5 Statistik

Die Statistikberechnungen wurden mit Hilfe von Graphpad 6.0. berechnet. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde der Test als statistisch signifikant gewertet.

---

\*In der Publikation von Bararia et al. wurden auch (subklonale) Mutationen mit einer Variant-Allele-Frequency  $< 10\%$  berichtet.<sup>23</sup>

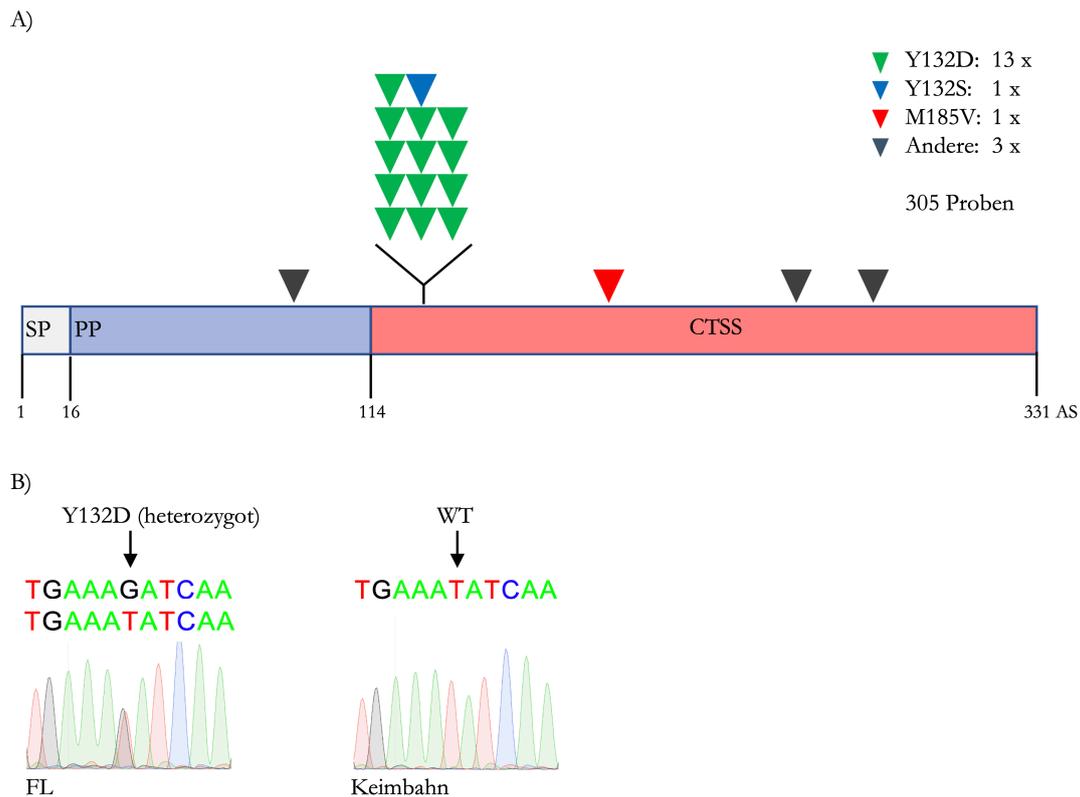
# 4

## Ergebnisse

### 4.1 CTSS Y132D ist eine Hotspot-Mutation

Durch die allogene Stammzelltransplantation wurde in dem geschilderten Fall (1.2) vom Spender eine Vorläuferpopulation des FL mit identischen BCL2 und IgH-Rearrangements auf den Empfänger übertragen. Bei Diagnosestellung neun Jahre nach allogener Stammzelltransplantation fielen neben identischen Mutationen in Spender und Empfänger, unterschiedliche Mutationen am Codon Y132 in CTSS auf, welche nicht in der Vorläuferpopulation der DLI nachweisbar waren. Diese unabhängige Entwicklung von CTSS Y132N (Spender) beziehungsweise CTSS Y132S (Empfänger) spricht für eine konvergente Evolution und damit für eine funktionelle Relevanz der Mutation. Im Gegensatz dazu steht die Mutation am Codon M185, welche zwar im Spender-FL und der Vorläuferzellpopulation nachweisbar war, aber nur in einer subklonalen Fraktion des Empfänger-FL. Dies legt nahe, dass CTSS M185V eine Begleitmutation ohne funktionellen Einfluss darstellt. In einer Analyse der Ergebnisse von Pastore et al. durch unsere Arbeitsgruppe zeigte sich eine statistisch signifikante Häufung von somatischen Mutationen in CTSS. Insgesamt wurde in 18 (6 %) von 305 Patienten bei

einem Cut-Off-Wert der Variant Allele Frequency von  $\geq 10\%$  eine Mutation in *CTSS* identifiziert. Eine Mutation betraf die Position M185 (1/ 18) und führte zu einem Tausch von Methionin (M) zu Valin (V). 78 % der Mutationen betrafen dahingegen die Position Y132 (14/ 18) und 93 % davon führten zu einem Tausch von Tyrosin (Y) zu Aspartat (D) (13/ 14).<sup>\*</sup> Um zu bestätigen, dass es sich um somatische Mutationen handelt, wurden die FL-Biopsien mit DNA aus dem peripheren Blut oder Knochenmarkmaterial verglichen.



**Abbildung 4.1:** Verteilung der Non-silent-Mutationen in *CTSS*: A) zeigt die Verteilung der Punktmutationen in *CTSS*. Die Mutationen sind je nach Aminosäuretausch farblich markiert. Tyrosin zu Aspartat ist in Grün, Tyrosin zu Serin in Blau, Methionin zu Valin in Rot und weitere nicht näher definierte Mutationen in Grau dargestellt. Es wurden 305 primäre FL-Biopsien untersucht. SP steht für Signalpeptid und PP für Propeptid. B) zeigt repräsentativ den Vergleich von Tumorbiopsie (links) und Keimbahnmaterial (rechts) nach PCR und Sanger-Sequenzierung. Die entscheidende Base wurden mit einem ↓ markiert.

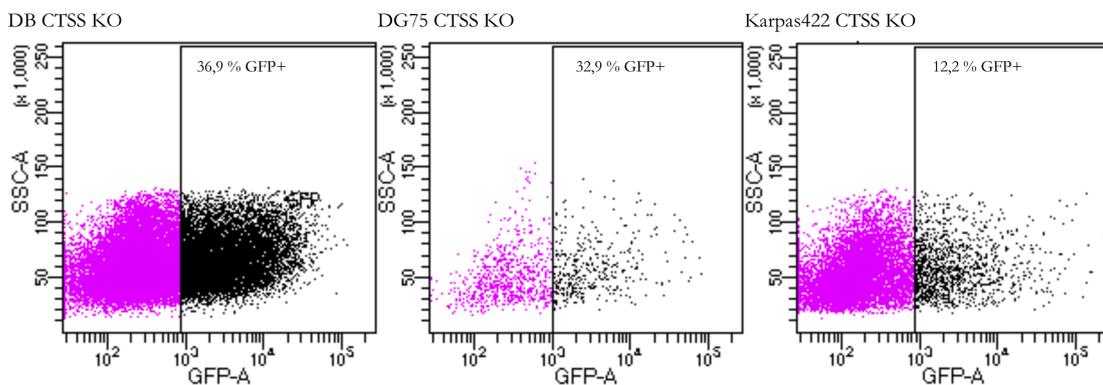
<sup>\*</sup>In der zugehörigen Publikation in *Cell Reports* wurden auch (subklonale) Mutationen mit einer Variant-Allele-Frequency < 10 % berichtet.<sup>23</sup>

## 4.2 Knock-out von CTSS

CRISPR-Cas9 wurde benutzt, um einen Doppelstrangbruch im Bereich der Exon 3-Intron-Region von *CTSS* zu induzieren, da hier die Spezifität des CRISPR-Cas9-Komplexes möglichst hoch und das Off-Targeting-Risiko möglichst niedrig sind.<sup>76</sup> Der Doppelstrangbruch wird von der Zelle in den allermeisten Fällen durch das Einfügen von Deletionen oder Insertionen im Rahmen der Non-homologous end-joining-Reparatur behoben, womit gegebenenfalls eine Frameshift-Mutation entsteht.

### 4.2.1 Transfektion und Sortierung

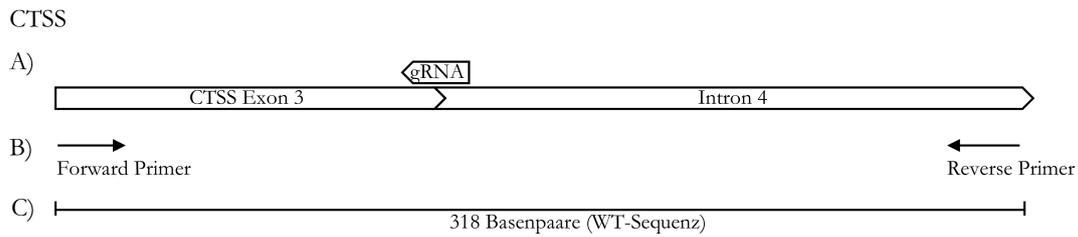
Für den KO wurden die t(14;18) positiven Lymphomzelllinien DB, DG75 und Karpas422 elektroporiert (3.2.2.5), mit dem KO-Plasmid transfiziert und 48 Stunden später sortiert. Dabei wurde eine Rate von 12,2 - 36,9 % an GFP-positiven Zellen erzielt, von denen wiederum die Zellen mit der höchsten GFP-Expression für die Einzelzellsortierung ausgewählt wurden.



**Abbildung 4.2:** Single Cell Sort der drei Zelllinien 48 Stunden nach Elektroporation mit dem CRISPR-Cas9-CTSS-KO-Plasmid: Schwarze Punkte entsprechen GFP-positiven Zellen.

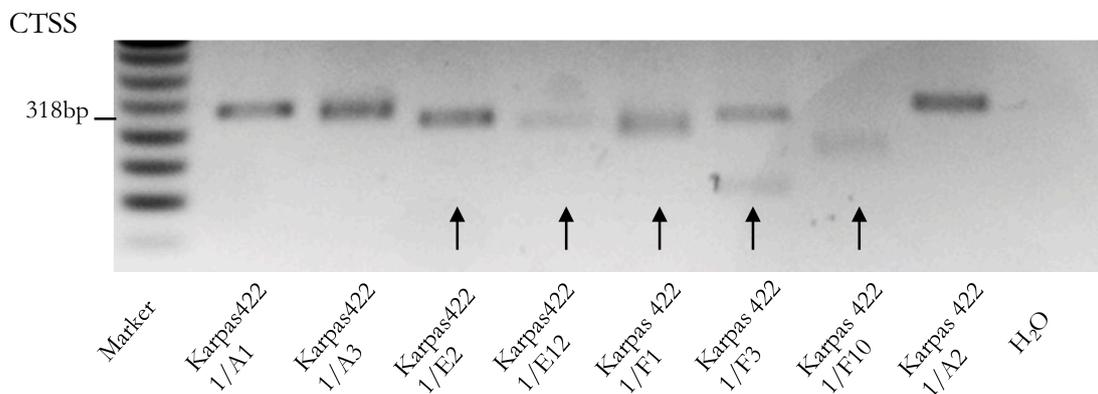
### 4.2.2 Screening der sortierten Zellen

Beim Screening der sortierten Zellen wurde überprüft, ob sich die PCR-Produktlänge der *CTSS* KO-Klone im Vergleich zur *CTSS* WT-Kontrolle verändert hatte. Dazu wurde die gDNA der KO-Klone extrahiert und mittels PCR vervielfältigt (3.2.3.5).



**Abbildung 4.3:** Strategie für den *CTSS* KO: A) zeigt die Lokalisation der gRNA, des Exons 3 und des Introns. B) zeigt die Lokalisation der Primer und C) die zu erwartende Produktgröße bei (unverändertem) *CTSS* WT.

Bei erfolgreicher Disruption weicht die Größe der PCR-Produkte der KO-Klone von der von *CTSS* WT ab.



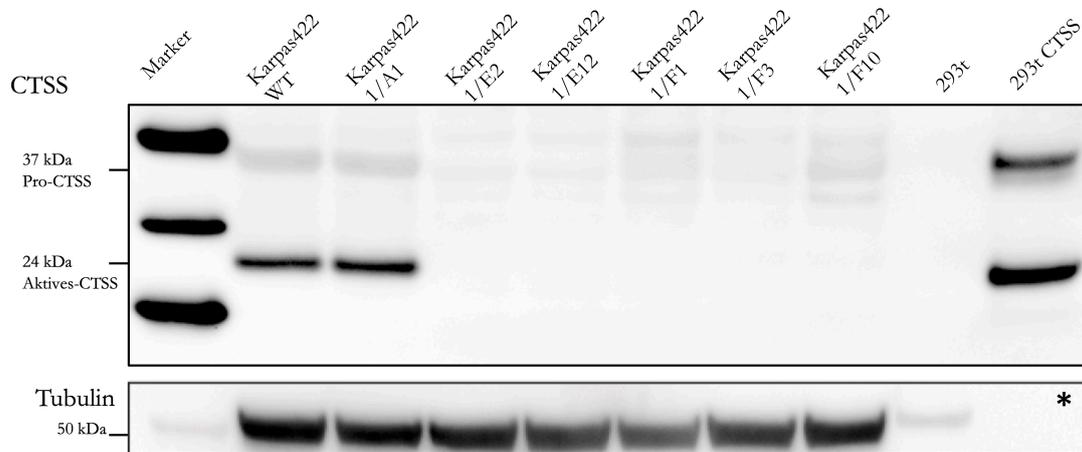
**Abbildung 4.4:** Exemplarisches PCR-Screening für den *CTSS* KO: Mit CRISPR-Cas9-*CTSS*-KO transfizierte Karpas422-Zellen wurden auf Veränderungen der Produktgröße im Agarosegel getestet. Mit ↑ sind Abweichungen von der 318 Basenpaar-WT-Produktlänge markiert.

Exemplarisch für alle Zelllinien zeigen die Karpas422 Klone 1/E2, 1/E12, 1/F1, 1/F3 und 1/F10 Veränderungen der Produktgröße und haben damit ein positives Screeningergebnis. Eine doppelte Bande, wie bei 1/F3, ist ein Hinweis darauf, dass die beiden Allele für *CTSS* unterschiedlich verändert wurden.

#### 4.2.3 Kontrolle der *CTSS*-Expression

Zur Verifizierung des *CTSS* KO wurde die *CTSS*-Expression auf Proteinebene im Western Blot überprüft. Pro-*CTSS* (37kDa) und aktives-*CTSS* (24kDa) sind bei den Kontrollen Karpas422 WT, Kar-

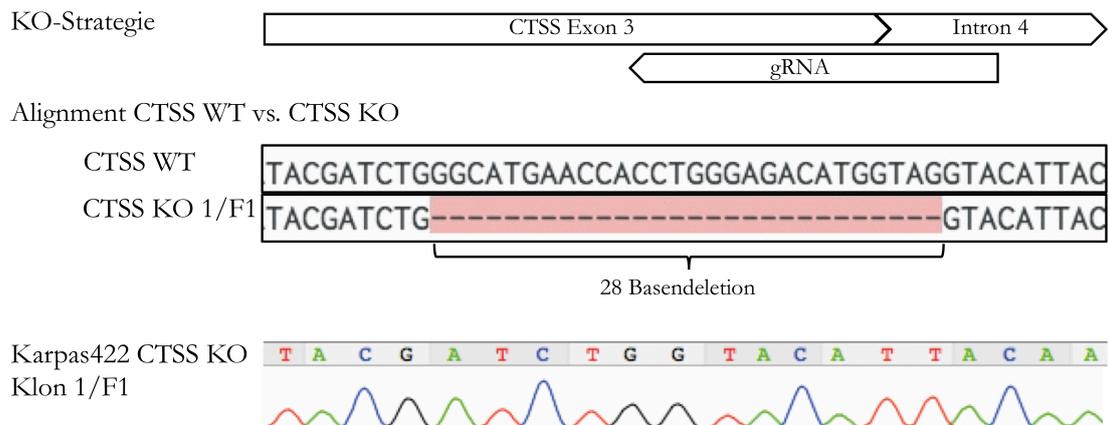
pas422 1/A1 und 293t CTSS zu erkennen. Bei den Einzelzellklonen mit positivem Screeningergebnis 1/E2, 1/E12, 1/F1, 1/F3 und 1/F10 ist dahingegen keine aktive Form von CTSS zu erkennen.



**Abbildung 4.5:** Western Blot-Kontrolle der Karpas422-Klone: Mit CRISPR-Cas9-CTSS-KO transfizierte Karpas422 Zellen wurden auf die CTSS-Expression getestet. Als Ladekontrolle wurde Tubulin benutzt. Bei \* wurde im Vergleich zu den anderen Proben weniger Protein geladen, sodass 293t CTSS in der Tubulin-Ladekontrolle nicht zu sehen ist.

#### 4.2.4 Bestätigung der Knock-out-Kandidaten

Zur finalen Bestätigung des *CTSS* KO wurde die Sanger-Sequenz der positiv gescreenten Klone analysiert. Diese wiesen alle unterschiedlich lange Insertionen oder Deletionen auf. Repräsentativ ist bei Klon 1/F1 die Verifizierungsstrategie gezeigt.



**Abbildung 4.6:** Verifizierung des *CTSS* KO: Oben ist die Strategie für den *CTSS* KO zu sehen. In der Mitte ist die Sequenz von Karpas422 *CTSS* WT der von Karpas422 *CTSS* KO Klon 1/F1 gegenübergestellt. Die 28 Basendeletion wurde durch } gekennzeichnet. Unten ist die Sanger-Sequenz von Karpas422 *CTSS* KO 1/F1 zu sehen.

Die Exon 3-Intron-Region wurde bei Klon 1/F1 im Bereich der guide-RNA durch eine 28 Basendeletion homolog beschädigt mit konsekutivem Frameshift.

#### 4.3 Knock-in von Y132D und M185V in *CTSS*

Auch hier wurde CRISPR-Cas9 benutzt, um einen Doppelstrangbruch zu erzeugen. Dieser soll anschließend im Rahmen der homologen Reparatur an Hand eines t-Oligos, der die KI-Mutation Y132D oder M185V enthält, behoben werden.

##### 4.3.1 Strategie Y132D

Für den Austausch von Tyrosin zu Aspartat wird das Basentriplett *tat* (Y) zu *Gat* (D) abgeändert. Durch diese Veränderung wird zusätzlich eine Restriktionsenzymstichstelle geschaffen, damit ein Screening der sortierten Zellen mit DpnII (5'↓GATC 3') möglich ist.

CTSS WT	V	K	Y	Q
130 -	GTG	AAA	TAT	CAA - 133
CTSS Y132D	V	K	D	Q
130 -	GTG	AAA	GAT	CAA - 133

**Abbildung 4.7:** Strategie für *CTSS* Y132D: Zu sehen sind die Aminosäuren- und Basensequenzen für *CTSS* WT (oben) und *CTSS* Y132D (unten). In Grün ist die zu verändernde Aminosäure beziehungsweise Base markiert.

#### 4.3.2 Strategie M185V

Für den Austausch von Methionin zu Valin wird das Basentriplett *atg* (M) zu *Gtg* (V) abgeändert. Zusätzlich wird noch eine weitere Veränderung an einer nicht kodierenden Base vorgenommen, damit ein Screening der sortierten Zellen mit *AciI* (5' C↓CGC 3') möglich ist. Hierfür wird *ggc* zu *ggC* abgeändert.

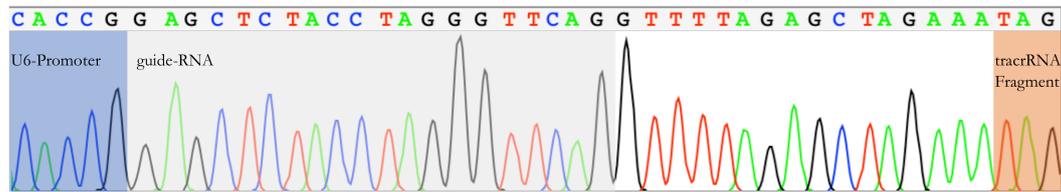
CTSS WT	G	G	F	M	T
182 -	GGT	GGC	TTC	ATG	ACA - 186
CTSS M185V	G	G	F	V	T
182 -	GGC	GGC	TTC	GTG	ACA - 186

**Abbildung 4.8:** Strategie für *CTSS* M185V: Zu sehen sind die Aminosäuren- und Basensequenzen für *CTSS* WT (oben) und *CTSS* M185V (unten). In Rot ist die zu verändernde Aminosäure beziehungsweise Base für M185V und in Blau die zu verändernde Aminosäure für die Restriktionsenzymstichstelle markiert.

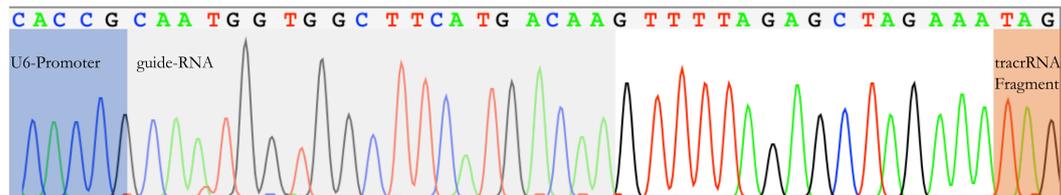
#### 4.3.3 Herstellung der CRISPR-Cas9-Plasmide für Y132D und M185V

Die guide-RNA für Y132D beziehungsweise M185V wurde in die zugehörige RNA-Kassette des pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Plasmids eingefügt (3.2.3.2) und mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid enthält neben dem U6-Promoter die tracrRNA und die guide-RNA-Sequenz für Y132D beziehungsweise M185V (Tabelle 3.9).

CTSS Y132D



CTSS M185V

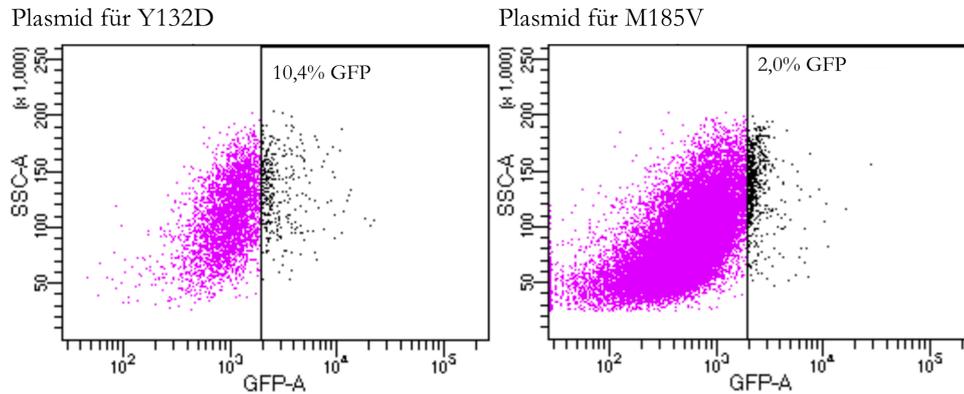


**Abbildung 4.9:** Kontrolle der Backbone-Sequenzen für *CTSS* Y132D und *CTSS* M185V: Der U6-Promoter ist blau, die eingefügte guide-RNA grau und der Beginn der tracrRNA orange markiert.

Die abgebildete Kontrolle zeigt die erfolgreiche Herstellung der Plasmide sowohl für *CTSS* Y132D, als auch *CTSS* M185V.

#### 4.3.4 Transfektion und Sortierung

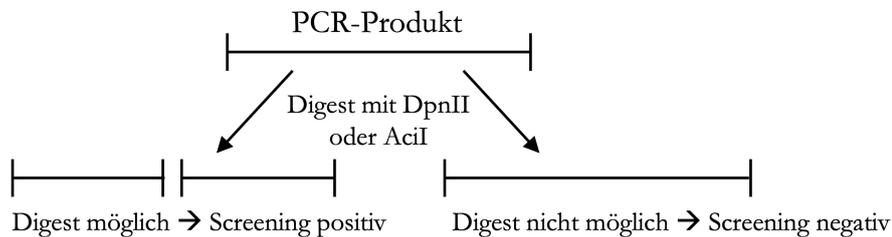
Karpas422-Lymphomzellen wurden mit dem Plasmid für Y132D beziehungsweise M185V und dem passenden t-Oligo (Tabelle 3.8) elektroporiert (3.2.2.5) und 48 Stunden später als Einzelzellen sortiert (3.2.2.6). Dabei wurde eine Rate von 10,4 % bei *CTSS* Y132D beziehungsweise 2,0 % bei *CTSS* M185V an GFP-positiven Zellen erzielt, von denen die Zellen mit der höchsten GFP-Expression für die Einzelzellsortierung ausgewählt wurden.



**Abbildung 4.10:** Single Cell Sort für CTSS Y132D und M185V: Zu sehen sind GFP-positive Zellen (schwarz) 48 Stunden nach Elektroporation mit dem Plasmid für CTSS Y132D beziehungsweise CTSS M185V.

#### 4.3.5 Screening der sortierten Zellen

Im Falle eines erfolgreichen KI wird zusätzlich eine Restriktionsenzymchnittstelle geschaffen, welche zum Screening der sortierten Zellen mittels eines Digests verwendet werden kann.



**Abbildung 4.11:** Prinzip des Digests: Bei erfolgreichem Einbau der Restriktionsenzymchnittstelle entstehen durch den Digest mit DpnII beziehungsweise AclI aus einem PCR-Produkt zwei Digest-Produkte.

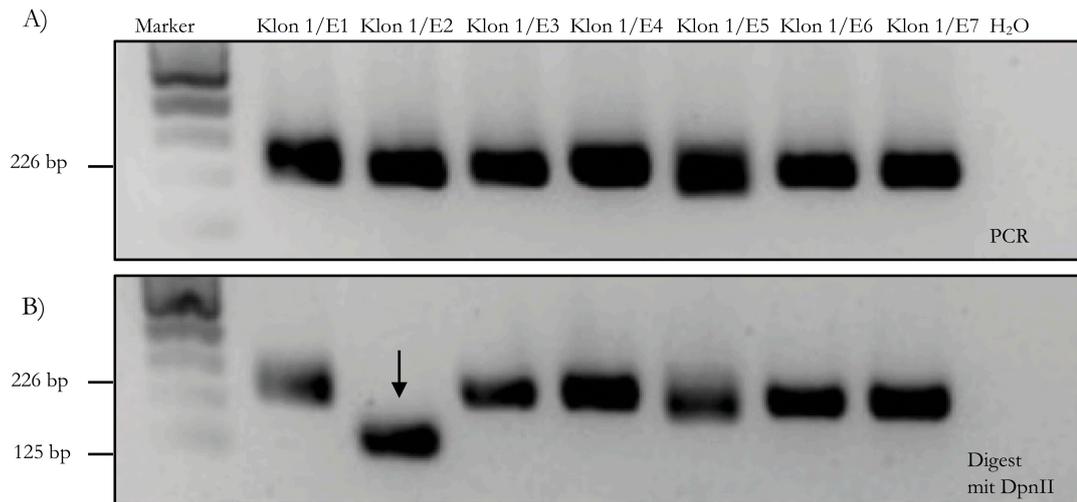
##### 4.3.5.1 Screening für Y132D

Zum Screening der sortierten Zellen wurde im ersten Schritt überprüft, ob die PCR-Produktlänge der CTSS Y132D-Klone mit der zur erwartenden Produktgröße von 226 Basenpaaren bei CTSS WT übereinstimmt. Dies ist in der untenstehenden Abbildung exemplarisch bei fünf von sieben Karpas422-Klonen der Fall. Eine kürzere Produktlänge spricht hingegen für durch CRISPR-Cas9

induzierte Deletionen. Da bei einer erfolgreichen Veränderung von *tat* (Y) zu *Gat* (D) die Restriktionsenzymchnittstelle 5'↓GATC 3' (DpnII) geschaffen wird, kann durch einen Digest mit DpnII überprüft werden, ob der KI von Y132D erfolgreich war.

#### Karpas422

##### CTSS Y132D



**Abbildung 4.12:** Screening auf Y132D: A) zeigt die Produktgröße von Karpas422-Klonen nach der PCR. B) zeigt die Produktgröße nach dem Digest mit DpnII. Mit ↓ ist eine Abweichung von der 226 Basenpaar-WT-Produktlänge markiert. Eine Veränderung der Bandenhöhe ist ein Indiz für einen erfolgreichen Digest und damit einen erfolgreichen KI. Screening in Kollaboration mit AG Bultmann.

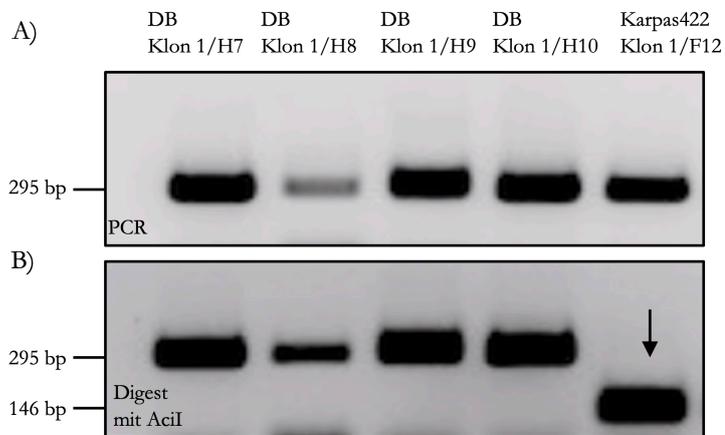
Bei Klon 1/E2 entstanden durch den Digest aus dem 226 Basenpaar langen PCR-Produkt zwei kleinere Digest-Produkte mit den berechneten Längen von 121 und 105 Basenpaaren.

#### 4.3.5.2 Screening für M185V

Beim Screening auf M185V zeigen exemplarisch fünf von fünf Klonen (DB und Karpas422) die zu erwartende Produktgröße von 295 Basenpaaren. Da im Falle einer erfolgreichen Veränderung von *ggt* (G) zu *ggC* (G) die Restriktionsenzymchnittstelle 5' C↓CGC 3' (AciI) geschaffen wurde, kann mit einem Digest überprüft werden, ob der KI von M185V erfolgreich war. Bei Klon 1/F12 entstanden durch den Digest aus dem 295 Basenpaar langen PCR-Produkt zwei kleinere Digest-Produkte mit den berechneten Längen von 149 und 146 Basenpaaren.

## Karpas422 und DB

CTSS M185V



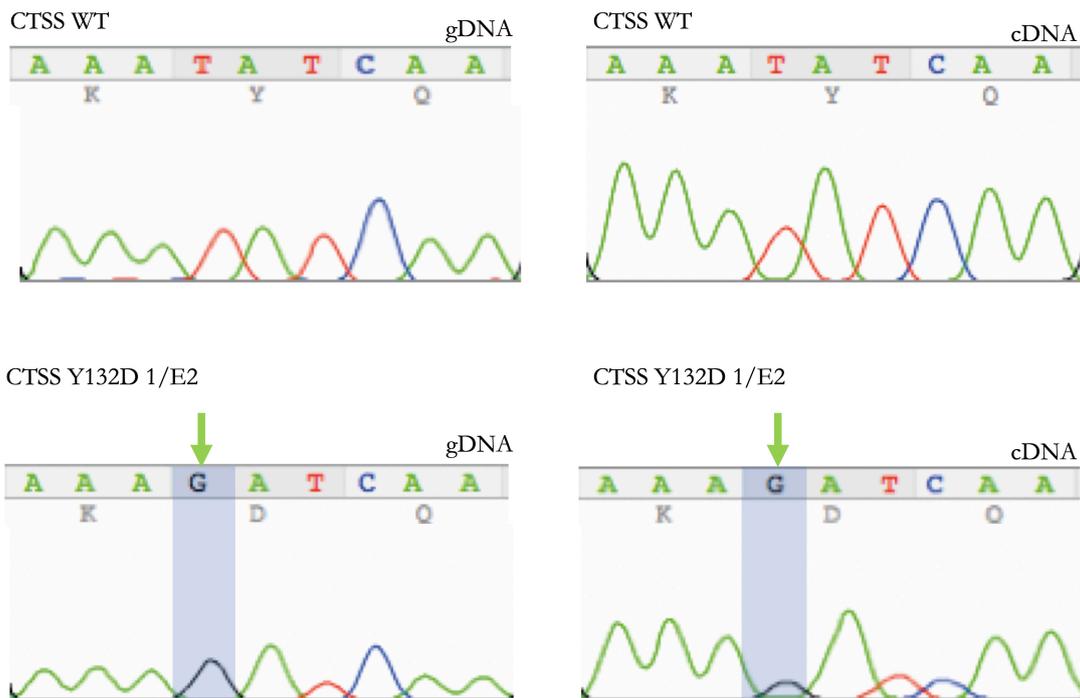
**Abbildung 4.13:** Screening auf M185V: A) zeigt die Produktgröße von Karpas422- und DB-Zellen nach der PCR. B) zeigt die Produktgröße nach dem Digest mit AclI. Mit ↓ ist eine Abweichung von der 295 Basenpaar-WT-Produktlänge markiert. Eine Veränderung der Bandenhöhe ist ein Indiz für einen erfolgreichen Digest und damit einen erfolgreichen KI. Screening in Kollaboration mit AG Bultmann.

### 4.3.6 Bestätigung der Knock-in-Kandidaten

Abschließend wurde der erfolgreiche KI der jeweiligen Mutation durch Sanger-Sequenzierung der gDNA respektive cDNA validiert.

#### 4.3.6.1 Verifizierung von Y132D

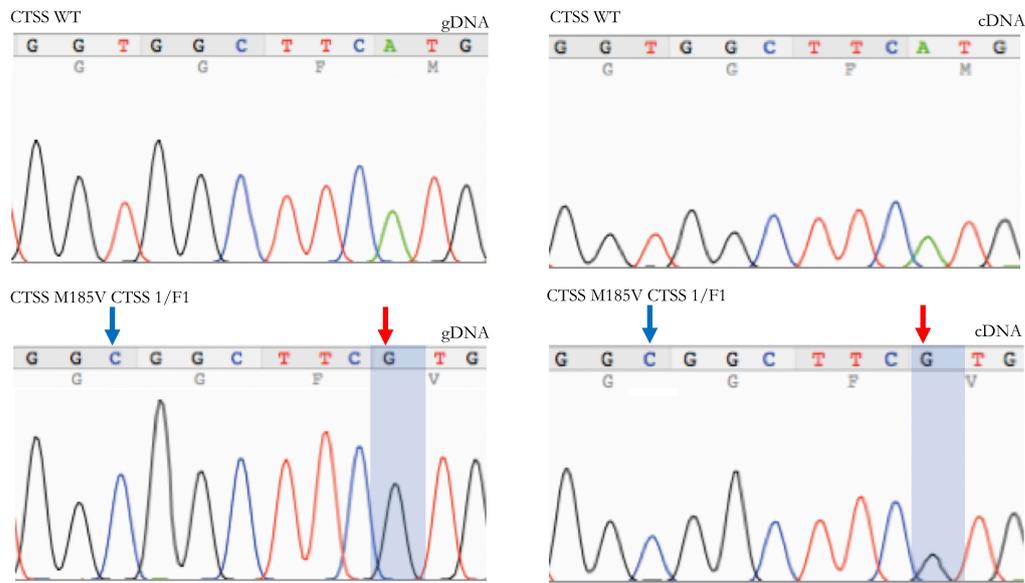
Bei Klon Karpas422 CTSS Y132D 1/E2 ist exemplarisch der erfolgreiche Basentausch von *tat* zu *Gat* und die damit eingehende Veränderung der Aminosäure von Y zu D sowohl in der gDNA als auch der cDNA zu sehen.



**Abbildung 4.14:** Sanger-Sequenz von Karpas422 CTSS WT (oben) vs. Karpas422 CTSS Y132D 1/E2 (unten): Die Analyse der gDNA (links) und cDNA (rechts) zeigt den erfolgreichen Tausch der Aminosäure an der Stelle 132 von Y zu D. Die Mutationsstelle wurde mit einem grünen ↓ markiert und blau hinterlegt.

#### 4.3.6.2 Verifizierung von M185V

Bei Klon Karpas422 CTSS M185V 1/F12 ist der erfolgreiche Basentausch von *atg* zu *Gtg* und die damit eingehende Veränderung der Aminosäure von M zu V sowohl in der gDNA als auch der cDNA ersichtlich. Zusätzlich wurde auch der Basentausch *ggt* zu *ggC* für die Restriktionsenzym-schnittstelle erfolgreich durchgeführt.



**Abbildung 4.15:** Sanger-Sequenz von Karpas422 CTSS WT (oben) vs. Karpas422 CTSS M185V 1/F12 (unten): Die Analyse der gDNA (links) und cDNA (rechts) zeigt den erfolgreichen Tausch der Aminosäure an der Stelle 185 von M zu V. Die Mutationsstelle wurde mit einem roten ↓ markiert und blau hinterlegt. Die zusätzliche Mutation für die Restriktionsenzymstichstelle ist mit einem blauen ↓ markiert.

#### 4.4 Zusammenfassung CRISPR-Cas9 Knock-in und Knock-out

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene Zelllinien mit den Konstrukten CTSS KO, CTSS Y132D und CTSS M185V transfiziert. Folgende Tabelle zeigt die final bestätigten Klone, welche für weitere Projekte benutzt wurden. Diese Klone wurden durch eine Kombination aus gDNA-, cDNA-Ergebnissen und der Proteinexpression im Western Blot verifiziert.

**Tabelle 4.1:** Übersicht der ausgewählten und bestätigten CRISPR-Cas9 Klone.

Zelllinie	Variante	Anzahl	Klon-Name
Karpas422	Y132D homozygot	3	1/E2, 1/F1, H41
	Y132D Heterozygot	4	A11, B3, B7, C9
	M185V Homozygot	1	1/F1
	M185V Heterozygot	0	
	KO Knock-out homozygot	6	1/E2, 1/E12, 1/F1, 1/F3, 1/A2, 1/A3
DB	Y132D Homozygot	0	

	Y132D	Heterozygot	1	A11
	M185V	Homozygot	0	
	M185V	Heterozygot	1	B4
	KO	Knock-out homozygot	2	1/A4, 1/A10
DG75	KO	Knock-out homozygot	5	1/A3, 1/B11, 1/D4, 1/F6, 1/F8

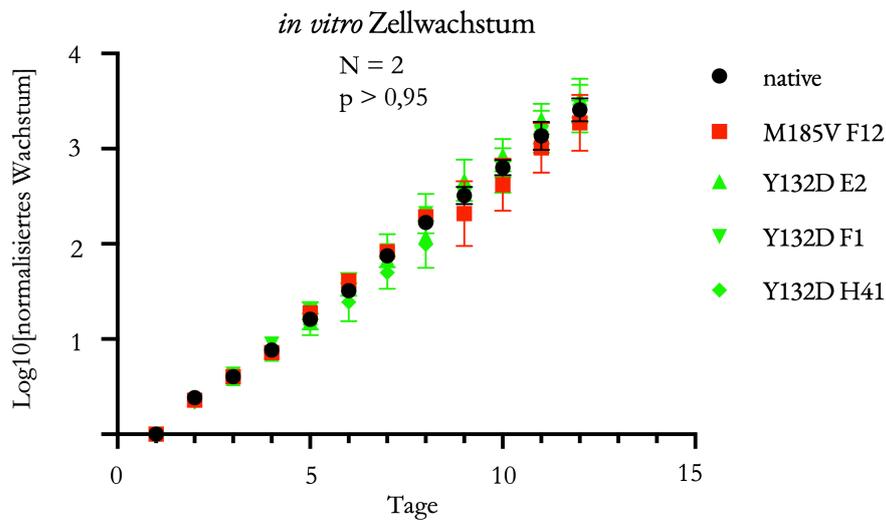
---

Für den *CTSS* KO wurden in drei unterschiedlichen Zelllinien insgesamt 2880 Zellen sortiert, von denen 14 abschließend verifiziert wurden. Dies entspricht einer Erfolgsrate von 1,6 %.

Für den *CTSS* KI wurden in drei Zelllinien über 5568 Zellen sortiert, von denen vier homozygote beziehungsweise sechs heterozygote KI sind. Dies entspricht einer Erfolgsrate von 0,07 % bei den homozygoten und 0,11 % bei den heterozygoten Klonen.

#### 4.5 Einfluss von *CTSS* Y132D auf das Zellwachstum

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es durch die Mutation *CTSS* Y132D oder *CTSS* M185V zu einem veränderten Wachstum im Vergleich zu nativen Karpas422-Zellen kommt. Die Analyse der Wachstumskurve zeigt, dass beide Mutationen keinen Einfluss auf das Zellwachstum haben.

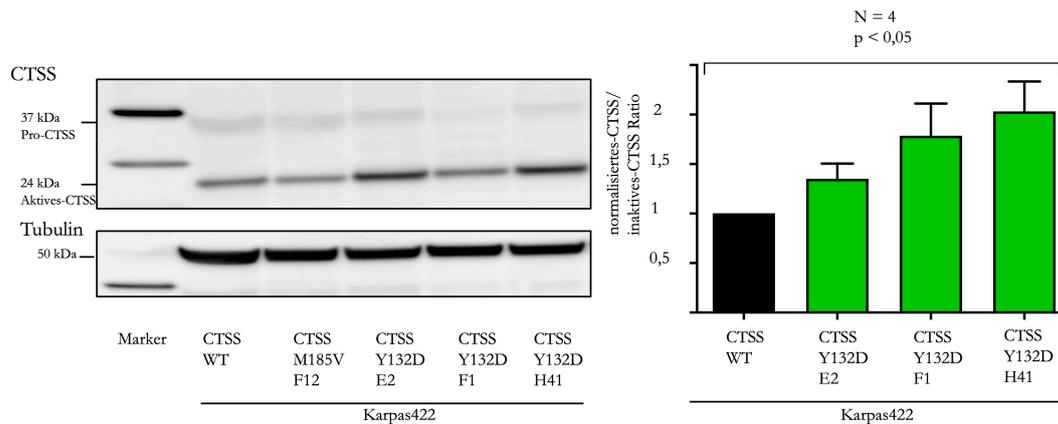


**Abbildung 4.16:** Wachstumskurve von Karpas422 CTSS WT, M185V und Y132D als normalisierter Logarithmus über 12 Tage.

#### 4.6 Erhöhung des aktiven Anteils von CTSS durch CTSS Y132D

Weiterhin wurde im Westernblot quantifiziert, inwieweit die CTSS-Expression durch die Mutation *CTSS* Y132D oder *CTSS* M185V beeinflusst wird. Die Analyse des Verhältnisses von aktiven-CTSS (24kDa) zu pro-CTSS (37kDa) zeigt, dass die Zelllinien mit CTSS Y132D einen 1,2 - 2,3 erhöhten Anteil an aktiven-CTSS im Vergleich zu CTSS WT oder CTSS M185V besitzen.\*

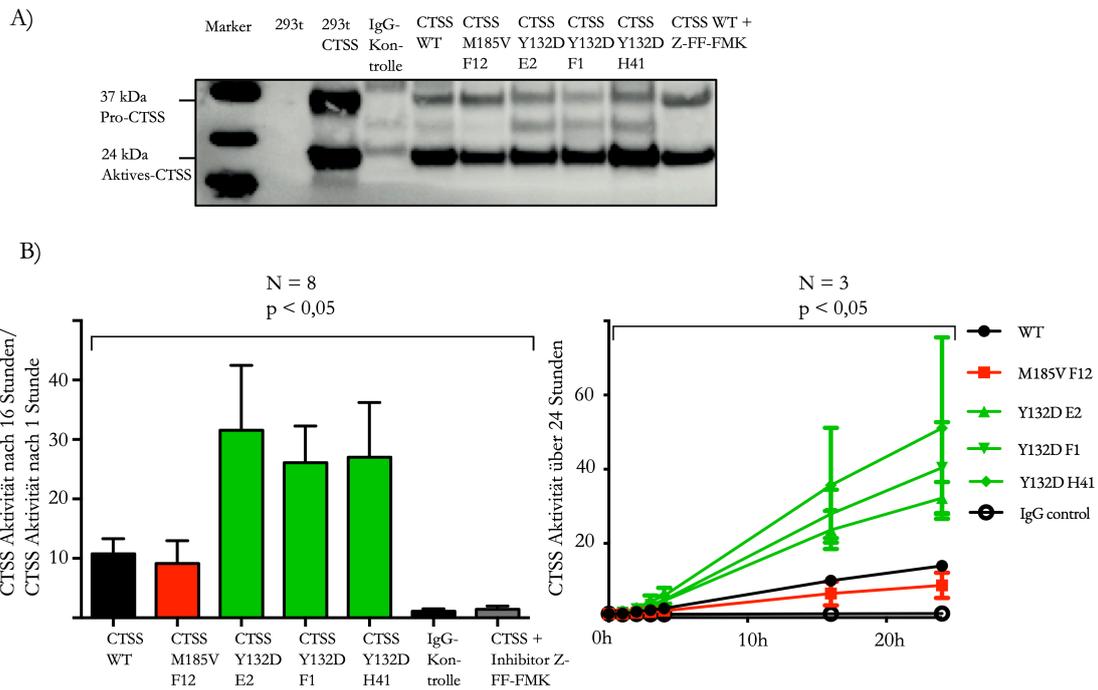
\*In der zugehörigen Publikation in *Cell Reports* wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, sodass die absoluten Zahlen im Vergleich zu dieser Arbeit variieren.<sup>23</sup>



**Abbildung 4.17:** Westernblot von Karpas422 mit CTSS WT und CRISPR-Cas9 veränderten Single-Zell-Klonen mit CTSS Y132D (E2, F1, H41) und M185V (F12) (links). Ratio von aktiven-CTSS zu inaktiven-CTSS in Karpas422 CTSS WT und CTSS Y132D (rechts).

#### 4.7 Steigerung der proteolytischen Aktivität durch CTSS Y132D

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob CTSS Y132D und das daraus resultierende veränderte Verhältnis von aktiven-CTSS zu pro-CTSS die proteolytische Aktivität von CTSS beeinflusst. Zur Messung der Aktivität wurde CTSS aus Karpas422 CTSS WT, den CRISPR-Cas9 Zelllinien Karpas422 CTSS Y132D 1/E2, 1/F1, H41 und Karpas422 CTSS M185V F12 mittels Immunpräzipitation isoliert. Damit soll sichergestellt werden, dass das mit einem AFC-Tag versehene künstliche CTSS-Substrat Z-VVR des Assays nur von CTSS und nicht von anderen Cathepsinen geschnitten wird. Mit Hilfe des künstlichen CTSS-Substrats wurde die Aktivität von CTSS WT, CTSS Y132D und CTSS M185V nach 16 Stunden beziehungsweise über 24 Stunden verglichen (3.2.1.6).



**Abbildung 4.18:** CTSS-Aktivitätsassay: A) zeigt durch Immunpräzipitation isoliertes CTSS und dient als Kontrolle für die in den Assay geladene CTSS-Menge. B) zeigt die Aktivität von CTSS WT (schwarz), CTSS M185V (rot) und CTSS Y132D (grün) nach einer Inkubation von 16 Stunden (links) und im zeitlichen Verlauf über 24 Stunden (rechts)-.

Als Ergebnis wird deutlich, dass die Mutation Y132D die proteolytische Aktivität *in vitro* von CTSS signifikant um das zweieinhalb- bis vierfache gegenüber CTSS WT oder CTSS M185V steigert.\* CTSS WT und CTSS M185V besitzen dahingehend eine vergleichbare Aktivität nach 16 beziehungsweise über 24 Stunden. Der CTSS Inhibitor Z-FF-FMK sorgt für einen Verlust der CTSS-Aktivität. Weiterhin zeigt sich in der Input-Kontrolle der Immunpräzipitation, dass die Mutation Y132D zu einem Größenshift von pro-CTSS Y132D im Vergleich zu pro-CTSS WT oder pro-CTSS M185V führt.

\*In der zugehörigen Publikation in *Cell Reports* wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, sodass die absoluten Zahlen im Vergleich zu dieser Arbeit variieren.<sup>23</sup>

# 5

## Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Mutation *CTSS* Y132D im FL validiert und durch funktionelle Analysen gezeigt, dass es sich um eine Gain-of-Function Mutation handelt, welche die Ratio von aktiven zu inaktiven *CTSS* beeinflusst und zu einer signifikant erhöhten Cleavage Aktivität von *CTSS* Y132D im Vergleich zu *CTSS* WT führt. Die Diskussion soll ein Erklärungsmodell für den auf der Position Y132 lastenden Selektionsdruck bieten und die durch diese Arbeit eröffneten Möglichkeiten für eine weitere Untersuchung der Mutation Y132D diskutieren.

### 5.1 Überblick über die Hauptergebnisse

#### 5.1.1 Hotspot-Mutation in *CTSS*

Diese Arbeit identifiziert und validiert die neue rekurrente Hotspot-Mutation Y132D (TAT>GAT) in *CTSS*. Dabei wird Tyrosin (Y), eine hydrophobe Aminosäure, durch Aspartat (D), eine polare, kleinere und stärker negativ geladene Aminosäure, ausgetauscht. Die konvergente, unabhängige Entwicklung von *CTSS*-Mutationen im Falle eines Donor-derived-FL nach Stammzelltransplan-

tation in Donor und Recipient an derselben Position und das gehäufte Auftreten in zwei unabhängigen Kohorten weist auf einen Selektionsdruck und funktionelle Relevanz hin.<sup>39</sup> Die ebenfalls nachgewiesene, aber in dieser Arbeit nicht charakterisierte Mutation *CTSS* Y132S (4.1), zeigte eine vergleichbare Cleavage Activity *in vitro* wie *CTSS* Y132D.<sup>23</sup> Der Grund für das gehäufte Auftreten von Y132D könnte in einer von Alexandrov et al. beschriebenen Mutationssignatur für maligne B-Zell-Lymphome und die chronisch lymphatische Leukämie liegen. In diesem Fall kommt es unter anderem an ApTpN-Sites von Tumoren, welche somatische Hypermutation am Immunglobulin Gen durchlaufen haben, zum bevorzugten auftreten des Basenaustausches von T zu G.<sup>23, 77</sup> Eine Abfrage des Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) ergab, dass für *CTSS* 89 Mutationen bekannt sind. Unter diesen befinden sich 69 Missense-Mutationen, 18 synonyme Substitutionen, eine Nonsense-Mutation und eine Frameshift-Deletion. Von den 69 Missense-Mutationen wurden neben Y132D und M185V nur neun weitere in mehr als einem Patienten detektiert. Darunter sind Mutationen in soliden Tumoren, wie dem malignen Melanom, dem großzelligen Lungenkarzinom, dem Ovarialkarzinom, dem Endometriumkarzinom, dem Cervixkarzinom, dem Merkelzellkarzinom, dem Kolonkarzinom, dem Rektumkarzinom und dem Ewing Sarkom.<sup>COSMIC-Datenbank: Abruf am 03.04.2019, 78</sup> Bis zum jetzigen Stand wurde keine der in COSMIC gelisteten Mutationen funktionell beschrieben. Die Mutation Y132D wurde bis jetzt nur im FL entdeckt, nicht jedoch im diffus großzelligen B-Zelllymphom. Allerdings sind bisher nur kleine Fallzahlen untersucht.<sup>79</sup> Da die meisten Targeting NGS Panel aktuell *CTSS* nicht einschließen, könnten Mutationen in *CTSS* weitaus häufiger als bisher angenommen auch in anderen Entitäten vorkommen. Um einen besseren Überblick über *CTSS* Mutationen zu erhalten, sollte *CTSS* in Zukunft in die Sequenzierpanels von soliden und nicht soliden Tumoren integriert werden.

### 5.1.2 Erfolgreicher *CTSS* Knock-in und Knock-out

Zur Herstellung der *CTSS* Y132D-, *CTSS* M185V- und *CTSS* KO-Zellen wurde CRISPR-Cas9, eine mittlerweile weit verbreitete Methode für Genome Editing, benutzt. Das hier verwendete Protokoll basiert auf dem Einfügen eines Doppelstrangbruches zur Veränderung einzelner Basen oder dem KO eines Genes.<sup>71</sup> Nachteile dieser Methode sind die Gefahr von Off-Targeting und die geringe Effektivität beim KI. Beim Off-Targeting schneidet CRISPR-Cas9 nicht (nur) an der Zielsequenz,

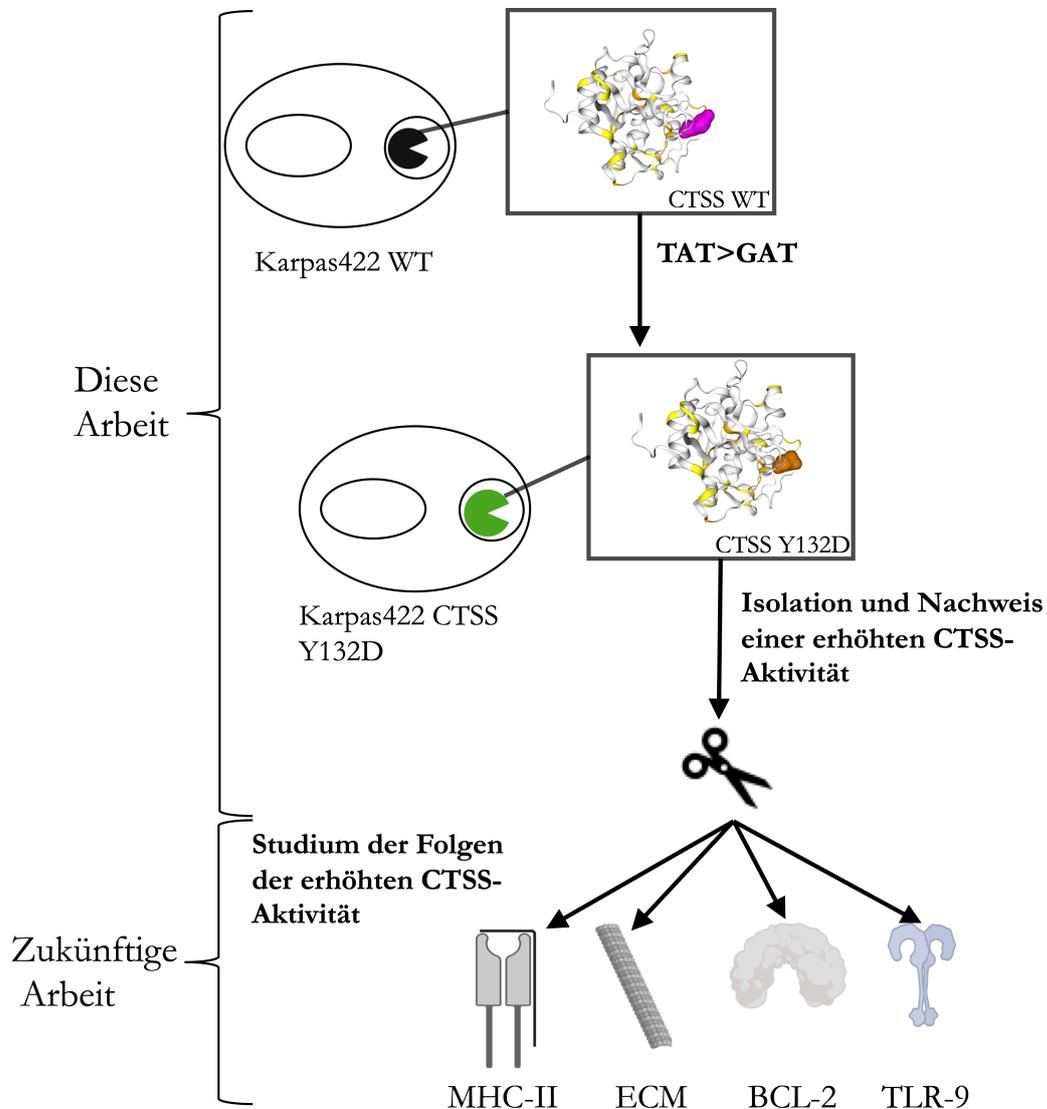
sondern auch (unerkant) an anderer Stelle im Genom, da die guide-RNA nicht 100% spezifisch für ihr Ziel ist. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit auch elektroporierte Zellen mit unauffälligen Screeningergebnissen in Kultur genommen, um sie als Kontrollen für die positiven Klone zu verwenden. Um sicher zu gehen, dass innerhalb von *CTSS* kein Off-Targeting stattfand, wurde zusätzlich das komplette für *CTSS* kodierende Gen sequenziert und der *CTSS*-Aktivitätsassay sowohl mit mehreren CRISPR-Cas9 Klonen, als auch mit transfizierten HEK293t-Zellen durchgeführt. Die geringe Effektivität des KI konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Von 5568 sortierten Zellen für den KI konnten nur vier (0,07%) homozygote und sieben (0,12%) heterozygote KI identifiziert werden. Es gelang nicht, homozygote KI in mehr als einer Zelllinie herzustellen. Um die Ergebnisse dieser Arbeit in einer weiteren Zelllinie verifizieren zu können, wurde der ebenfalls in dieser Arbeit erstellte DG75 *CTSS* KO Klon 2/A1, welcher eine homologe 1 Basenpaardeletion aufweist, mit pCIG *CTSS* WT, pCIG *CTSS* Y132D oder pCIG Empty Vector transfiziert. Mittlerweile gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Effektivität von KI Veränderungen zu erhöhen, welche zum Zeitpunkt der experimentellen Versuche dieser Arbeit noch nicht bekannt waren. Eine davon ist die Unterdrückung der nicht-homologen Reparatur mittels spezifischen chemischen Inhibitoren oder durch die Koexpression eines Adenoviruses.<sup>80</sup> Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von CRISPR-Cas9-Systemen, welche den Basenaustausch ohne Doppelstrangbruch durchführen und die Effektivität auf bis zu 50% erhöhen können.<sup>81</sup> Die in dieser Arbeit versuchsweise durchgeführte Strategie die Non-homologous-end-joining-Reparatur chemisch durch S2-Blockade zu inhibieren und damit die Wahrscheinlichkeit für die Homologous-Reparatur zu steigern, war nicht erfolgreich. Die Rate der erfolgreichen KO-Zellen (2880 sortierte Zellen, 480 gescreente Zellen) lag im Vergleich zum KI deutlich höher und der KO war zudem in drei verschiedenen Zelllinien erfolgreich.

### 5.1.3 Y132D ist eine Gain-of-Function Mutation

Durch den erfolgreichen KI der Hotspot-Mutation in Karpas422 war es im nächsten Schritt möglich, *CTSS* mittels Immunpräzipitation zu isolieren und zu sammeln. Hierdurch wurde gewährleistet, dass keine Interaktionen mit anderen Cathepsinen auftraten und isoliert die Aktivität von *CTSS* gemessen wurde. Die Isolation gleicher Menge an *CTSS* stellte zudem sicher, dass auch eine möglicherweise bestehende Hemizygotie keinen Einfluss auf den *CTSS*-Aktivitätsassay ausübt.

Durch die Veränderung Y132D kommt es zu einer Verschiebung der Ratio von aktiven zu inaktiven CTSS zugunsten von aktiven CTSS und zusätzlich zu einer Steigerung der proteolytischen Aktivität um das Zweieinhalb- bis Vierfache im Vergleich zu CTSS WT oder CTSS M185V. CTSS Y132D ist damit eine Gain-of-Function Mutation. Ursächlich für die veränderte Ratio und die erhöhte Cleavage-Aktivität können mehrere Mechanismen sein. Der Austausch von Tyrosin zu Aspartat könnte zu einer erhöhten autokatalytischen Konversion von inaktiven CTSS zu aktiven CTSS führen. Auf diese Möglichkeit weist die beschriebene veränderte Ratio von aktiven zu inaktiven CTSS und das Auftreten einer zusätzlichen intermediären Bande bei CTSS Y132D hin. Auswertungen der Halbwertszeit unterstützen dies, da pro-CTSS WT eine längere Halbwertszeit als pro-CTSS Y132D besitzt und somit langsamer zu aktiven CTSS prozessiert wird.<sup>23</sup> Weiterhin könnte die Hotspot-Mutation zu einer strukturellen Änderung in CTSS führen, welche zu einem verzögerten Abbau von aktivem CTSS führt. Computersimulationen zeigten weiterhin, dass es durch Y132D zu einer Veränderung der Tertiärstruktur kommt. Es verringert sich der Abstand zwischen Cystein-139, welches Teil der aktiven Triade C139-H278-N298 ist, und verschiedenen Cleavage-Sites, welche für die autokatalytische Aktivierung von essentieller Bedeutung sind.<sup>23, 82</sup> Dies kann zu einer erhöhten autokatalytischen Aktivierung und damit zu einer erhöhten Aktivität von CTSS führen. Ein weiterer Grund für die erhöhte CTSS-Aktivität kann der Verlust der Eigenschaften von Tyrosin sein. Tyrosin besitzt eine Hydroxylgruppe, welche im Rahmen von posttranslationalen Regulationsmechanismen phosphoryliert werden kann. Aspartat dahingegen ähnelt mit seiner negativen Ladung einer phospho-mimetic Stelle und gilt damit als „dauerphosphoryliert“. CTSS Y132D könnte daher anderen Regulationsmechanismen als CTSS WT unterliegen. Um zu untersuchen, ob Y132 eine aktive Phosphorylierungsstelle ist, sollte isoliertes CTSS WT und CTSS Y132D mit einem Phosphataseinhibitor behandelt und die Aktivität von CTSS WT mit CTSS Y132D verglichen werden. Umgekehrt könnte in einem weiteren KI-Experiment Tyrosin durch Alanin an der Stelle 132 ersetzt werden, um eine nicht zu phosphorylierende Aminosäure zu simulieren. Durch massenspektrometrische Analyse von CTSS konnte unsere Arbeitsgruppe neben der bereits bekannten Cleavage-Site S94 auch zwei neue, bisher unbekannte Cleavage-Sites (D82, S95) identifizieren, welche in CTSS Y132D dazu führen, dass die Position 132 näher an die aktive Triade C139-H278-N298 gelangt und somit eventuell eine verstärkte autokatalytische Aktivierung erfolgt.<sup>23</sup>

## 5.2 Mögliche Auswirkungen abnormaler CTSS-Aktivität



**Abbildung 5.1:** Übersicht über die bisherige Arbeit und Ausblick auf mögliche Auswirkungen von abnormaler CTSS-Aktivität. Grafiken von Biorender und Cosmic-3D.<sup>83</sup>

Da auf Grund der Pathologie und Entstehung des FL im Keimzentrum keine stabilen originären FL-Zelllinien existieren, wurden in dieser Arbeit Non-Hodgkin-B-Zelllymphom-Zellen verwendet, welche das molekulare Charakteristikum t(14;18) des FL enthalten.<sup>84</sup> Die etablierten Karpas422 CRISPR-Cas9 CTSS-Klone erlauben es, die Auswirkungen der Gain-of-Function Mutation Y132D

zu studieren. Daneben können auch andere Mechanismen zu einer erhöhten CTSS-Aktivität führen. So ist der epigenetische transkriptionelle Suppressor *BLIMP1/PRDM1*, welcher für die Transkription von *CTSS* verantwortlich ist, in malignen Lymphomen nachweislich deletiert. Dies kann konsekutiv zu einer unregulierten Transkription und damit zu einem erhöhten Vorliegen von CTSS führen.<sup>23, 85, 86</sup> Weiterhin liegt *CTSS* auf Chromosom 1 Arm q-21, welches im FL nachweislich gehäuft von Amplifikationen betroffen ist und somit zu einer erhöhten *CTSS*-Transkription führen könnte.<sup>23, 87</sup> Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin nachweisen, dass es durch erhöhte Copy Number Gain beziehungsweise *CTSS*-Amplifikationen zu einer erhöhten *CTSS*-Expression kommt. Damit liegt die Anzahl der FL-Patienten, welche von einer *CTSS*-Hyperaktivität (*CTSS*-Überaktivität oder *CTSS*-Überexpression) betroffen sind, wahrscheinlich bei ungefähr 20%.<sup>23</sup>

### 5.2.1 Intrazelluläre Auswirkungen

*CTSS* ist nach aktuellem Stand notwendig für die erfolgreiche MHC-II-Prozessierung.<sup>54</sup> Zusätzlich ist *CTSS* auch an der Prozessierung von TLR9 und der BCL2-Familie beteiligt, welche in der Pathogenese von Tumoren ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen.<sup>55, 56</sup>

#### 5.2.1.1 Einfluss von *CTSS* auf MHC-II

Genexpressionsanalysen zeigen, dass *CTSS* besonders stark in antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird.<sup>88</sup> Dies legt den Schluss nahe, dass eine erhöhte *CTSS*-Aktivität die Prozesse der Antigenpräsentation und Immunantwort direkt beeinflusst. Der prominente Stellenwert von *CTSS* in der CD74-Prozessierung konnte in Karpas422 *CTSS* KO-Zellen bestätigt und die Akkumulation von 8 beziehungsweise 10 kDa großen CD74-Fragmenten nachgewiesen werden.<sup>Daten nicht gezeigt, 89</sup> Durch eine erhöhte *CTSS*-Aktivität könnte es daher umgekehrt zu einer beschleunigten CD74-Prozessierung und einer erhöhten MHC-II-Expression kommen. Da bereits bekannte Mutationen, zum Beispiel in *CREBBP*, die MHC-II-Expression verändern und die Prognose des Patienten beeinflussen, sollte untersucht werden, ob *CTSS* Y132D die MHC-II-Expression und gegebenenfalls auch das Overall Survival beeinflusst.<sup>24, 39</sup>

Um mögliche Auswirkungen von *CTSS* Y132D auf die Antigenpräsentation zu untersuchen, verwendete unsere Arbeitsgruppe einen T-Zell-Stimulationsversuch. Dabei wurden Karpas422 und

DG75 CTSS KO-Zellen mit *CTSS* Y132D retransfiziert beziehungsweise die etablierten Single-Zell Klone CTSS Y132D E2 und CTSS KO F1 verwendet. Die Zellen wurden mit MHC-II transfiziert und mittels verschiedener Antigene (EBNA-LP, BZLF1, BMLF1 oder BBLF1) stimuliert. Anschließend wurden entweder CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hinzugegeben und über 20 Stunden inkubiert. Abschließend wurde die IFN- $\gamma$ -Sekretion stellvertretend für die Aktivität der T-Zellen mittels ELISA quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen mit *CTSS* Y132D oder *CTSS* Überexpression eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion und damit eine höhere Aktivität von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu CTSS WT beziehungsweise CTSS KO zeigen. Die Aktivität der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde dahingegen durch die Mutation Y132D nicht beeinflusst.<sup>23</sup> Lee et al. zeigten in einer retrospektiven Analyse von FL-Proben, dass es zwischen einer Long Survival Group (>15 Jahre) und Short Survival Group (<5 Jahre) zu signifikanten Unterschieden im immunhistochemischen Nachweis von CD4<sup>+</sup>-Zellen kommt. Ein erhöhter Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen war dabei vor allem in der Long Survival Group nachweisbar.<sup>90</sup> Die Auswertung von Patientendaten in zwei unabhängigen Kohorten durch unsere Arbeitsgruppe zeigte weiterhin, dass Patienten mit einer CTSS Hyperaktivität ein verlängertes Progress Free Survival und Overall Survival aufweisen.<sup>23</sup> Die Mutation CTSS Y132D könnte also über eine erhöhte CTSS-Aktivität zu einer erhöhten Aktivität von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und einem verlängerten Overall Survival führen.

#### 5.2.1.2 Einfluss von CTSS auf die BCL2-Familie

Cathepsine sind eng in Signalwege der zellulären Apoptose integriert. Die BCL2-Familie besteht aus verschiedenen Proteinen, welche proapoptische oder antiapoptische Eigenschaften besitzen.<sup>91</sup> Cathepsine werden nach der Lysosome Membrane Permeabilisation in das Zytosol freigesetzt. Unter den dort vorherrschenden neutralen pH-Bedingungen ist CTSS hoch aktiv.<sup>48</sup> Sie können anschließend die antiapoptischen Proteine Bcl2 beziehungsweise Mcl1 inaktivieren und proapoptische Proteine wie Bak, Bax, Bid und Mcl1 durch Cleavage aktivieren.<sup>56</sup> Droga-Mazovec et al. zeigten, dass Bcl2, Mcl1 und Bak durch Cathepsine prozessiert werden, sobald diese mittels eines Lysosome Membrane Permeabiliser (LeuLeuOMe) aus dem Lysosom freigesetzt werden. CTSS inaktiviert vor allem die antiapoptischen Proteine Bak und Mcl1.<sup>56</sup> Eine CTSS Hyperaktivität könnte bei Zellstress zur Senkung der Schwelle der Apoptoseinduktion führen. Umgekehrt könnte ein *CTSS* KO zu ei-

ner erhöhten Zellviabilität unter Stressbedingungen führen. Zum genaueren Studium der Rolle von CTSS sollten die etablierten Zelllinien mit steigenden Dosen LeuLeuOMe behandelt werden und die Proteinexpression der BCL2-Familie, die Zellviabilität und die Aktivität der Caspasen bestimmt werden.

### 5.2.1.3 Einfluss von CTSS auf TLR9

TLR9 gehört zur Familie der TLR und wird für die Erkennung von pathogen-assoziierten molekularen Mustern benötigt.<sup>92</sup> CTSS ist dabei an der Kürzung der Ektodomäne von TLR9 entscheidend beteiligt, nachdem TLR9 durch CpG-Sequenzen aktiviert wurde.<sup>93, 94, 95</sup> Nicht korrekt prozessierte TLR9 sind unter anderem nicht komplett funktional und können zum Beispiel MyD88 nicht ausreichend rekrutieren.<sup>96</sup> Phelan et al. beschreiben für das diffus großzellige B-Zell-Lymphom, dass MyD88 zusammen mit TLR9 und BCR essentiell für die Bildung eines My-T-BCR Superkomplex ist. Dieser Superkomplex kann anschließend unter anderem mit mTOR am Endolysosom interagieren und ist für Pro Survival-Signale mittels NF $\kappa$ B beziehungsweise mTOR verantwortlich.<sup>97</sup> Eine CTSS Hyperaktivität könnte eine verstärkte Aktivierung von TLR9 und gegebenenfalls eine verstärkte MyD88-Rekrutierung nach sich ziehen. Die TLR9- beziehungsweise MyD88-Expression in den etablierten CTSS Y132D Single Cell-Zelllinien könnte, wie bei Phalen et al. gezeigt, mittels konfokaler Mikroskopie und eines Proximity Ligation Assays, bestimmt werden.

## 5.2.2 Extrazelluläre Auswirkungen von CTSS Y132D

Da CTSS auch unter neutralen pH-Bedingungen proteolytisch aktiv bleibt, kann es nach seiner Sekretion extrazellulär wirken.<sup>48, 49, 50</sup> Dabei ist CTSS unter anderem am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt.<sup>57</sup>

### 5.2.2.1 CTSS Y132D unter neutralen pH-Bedingungen

Die autokatalytische Aktivierung von CTSS verläuft unter sauren pH-Bedingungen schneller als unter neutralen.<sup>45</sup> Der in dieser Arbeit eingesetzte CTSS-Aktivitätsassay wird bei einem pH von 5,5 durchgeführt. Um die Gegebenheiten im Extrazellulärraum adäquat zu simulieren, sollte der CTSS-

Aktivitätsassay mit den Karpas422-Zelllinien unter neutralen pH-Bedingungen wiederholt werden. Weiterhin sollte die Sekretion via vesikulärer Exozytose von CTSS WT gegenüber CTSS Y132D verglichen werden.

#### 5.2.2.2 Einfluss von CTSS auf den Abbau der extrazellulären Matrix

Auch wenn lymphatische Neoplasien nicht im klassischen Sinn metastasieren, sollte auf die Beteiligung von Cathepsinen am Umsatz der extrazellulären Komponenten und Matrix hingewiesen werden. CTSS kann sowohl die Grundmembran als auch intrazelluläre Matrixproteine abbauen, was für die Angio- und Metastasiogenese von soliden Tumoren eine entscheidende Rolle spielt.<sup>57, 98</sup> Im Astrozytom ist die CTSS-Expression im Vergleich zu normalem Hirngewebe signifikant erhöht. Eine CTSS-Inhibition führte zu einer um 60 % reduzierten Tumordinvasion *in vitro*.<sup>99</sup> In einem CTSS-KO-Pankreasinzell-Karzinommodell kam es durch den Einsatz von CTSS-Inhibitoren *in vitro* zur Reduktion der Tumorgroße und Angiogenese. Dies wurde unter anderem auf den cathepsinabhängigen Abbau des antiproliferativ wirkenden E-Catherin zurückgeführt.<sup>60</sup> CTSS ist außerdem am Abbau von Laminin-5 beteiligt. Daraus entstehende Produkte sind ebenfalls für die Zelladhäsion, -migration, -invasion und Metastasierung notwendig.<sup>100</sup> Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CTSS beim Abbau von Proteinen der JAM-Familie, welche für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke wichtig sind, eine wichtige Rolle einnimmt. Eine CTSS-Inhibition führte zu einer signifikanten Reduktion von Gehirnmastasen im Tiermodell.<sup>59, \*</sup> Aus diesem Grund sollten auch die in 5.1.1 erwähnten Mutationen in soliden Tumoren auf Auswirkungen auf die CTSS-Aktivität untersucht werden.

#### 5.2.3 CTSS-Inhibitoren

CTSS-Inhibitoren sind Gegenstand aktueller Forschung. Im Zusammenhang mit der proangiogenetischen Wirkung und der Degradation der extrazellulären Matrix werden sie unter der Prämisse getestet, die Metastasierungswahrscheinlichkeit zu senken. Es wurde gezeigt, dass die Gabe eines CTSS-Inhibitors zu einer deutlichen Reduzierung von Gehirnmastasen in einem Brustkrebs-

---

\* Als Quelle für die Beteiligung von CTSS an der Degradierung der extrazellulären Matrix und seiner Rolle in Erkrankungen diene weiterhin der Review von Wilkinson, 2015.

Mausmodell oder zu einer Reduktion von Metastasen im hepatozellulären Karzinom *in vitro* führt.<sup>59, 101</sup> CTSS-Inhibitoren werden unter anderem weiterhin getestet, um die MHC-II-Präsentierung einzuschränken und damit die überschießende Aktivität des Immunsystems bei Psoriasis oder rheumatoider Arthritis zu reduzieren.<sup>102</sup>

### 5.3 Schlussfolgerung

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass *CTSS* rekurrent und signifikant im FL mutiert ist (18/ 305). Auch wenn nur in 6 % der Fälle eine *CTSS* Mutation nachgewiesen wurde, betrafen ein Großteil (78 %) der Mutationen den gleichen Hotspot Y132 (14/ 18). Die somatischen Missense-Mutationen an der Position Y132 führten in 93 % der Fälle zu einem Austausch von Tyrosin zu Aspartat (13/ 14). Mittels CRISPR-Cas9 gelang es, die Hotspot-Mutation Y132D und die Mutation M185V in BCL2-positiven Lymphomzellen zu etablieren. Parallel konnte ebenfalls ein *CTSS* KO erstellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei *CTSS* Y132D die Ratio von aktiven zu inaktiven *CTSS* zugunsten von aktiven *CTSS* im Vergleich zu *CTSS* WT verschoben ist. Aus den Single-Cell-Klonen konnte mittels Immunpräzipitation endogenes *CTSS* Y132D beziehungsweise *CTSS* WT isoliert werden und die Cleavage Aktivität gemessen werden. *CTSS* Y132D besitzt eine zweieinhalb bis vierfach erhöhte Cleavage Aktivität im Vergleich zu *CTSS* WT und stellt damit eine Gain-of-Function Mutation dar. Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine *CTSS* Überaktivität auch durch eine Überexpression von *CTSS* auftreten kann und somit ungefähr 20 % der FL-Patienten eine *CTSS*-Hyperaktivität besitzen. Die Auswertung von Patientendaten in zwei unabhängigen Kohorten zeigte weiterhin, dass Patienten mit einer *CTSS* Hyperaktivität ein verlängertes Progress Free und Overall Survival unter Therapie aufweisen.<sup>23</sup> Im nächsten Schritt sollten weitere *in vitro* beziehungsweise *in vivo* Studien durchgeführt werden, um die Auswirkungen von *CTSS*-Hyperaktivität besser zu verstehen.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	CTSS Struktur . . . . .	7
1.2	MHC-II Prozessierung . . . . .	8
4.1	Mutationsdiagramm . . . . .	31
4.2	Single Cell Sort KO . . . . .	32
4.3	Strategie CTSS KO . . . . .	33
4.4	PCR-Screening KO . . . . .	33
4.5	Western Blot CTSS KO . . . . .	34
4.6	Verifizierung des CTSS KO . . . . .	35
4.7	Strategie CTSS Y132D . . . . .	36
4.8	Strategie CTSS M185V . . . . .	36
4.9	Kontrolle Sequenz Backbone . . . . .	37
4.10	Single Cell Sort KI . . . . .	38
4.11	Schema Digest . . . . .	38
4.12	Screening der Single Cell Klone Y132D . . . . .	39
4.13	Screening der Single Cell Klone M185V . . . . .	40
4.14	Verifizierung des Knock-in Y132D . . . . .	41
4.15	Verifizierung des Knock-in M185V . . . . .	42
4.16	Wachstumskurve . . . . .	44
4.17	CTSS KI Westernblot . . . . .	45
4.18	CTSS Aktivitätsassay . . . . .	46
5.1	Übersichtsgrafik . . . . .	51

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Sebastian Stolz, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Validierung und funktionelle Charakterisierung einer Cathepsin S - Gain-of-Function Mutation im Follikulären Lymphom“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, 07.12.2021  
Ort, Datum

Sebastian Stolz  
Unterschrift Doktorand

# Literaturverzeichnis

- [1] S. H. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles, A. D. Zelenetz, and E. S. Jaffe, "The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.," *Blood*, vol. 127, pp. 2375–2390, May 2016.
- [2] R. Koch-Institut, "Zentrum für Krebsregisterdaten (Daten des Jahres 2014. Abruf am 09.04.2019)." Robert Koch-Institut, 2019.
- [3] P. P. Carbone, H. S. Kaplan, K. Musshoff, D. W. Smithers, and M. Tubiana, "Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification.," *Cancer Research*, vol. 31, pp. 1860–1861, Nov. 1971.
- [4] T. A. Lister, D. Crowther, S. B. Sutcliffe, E. Glatstein, G. P. Canellos, R. C. Young, S. A. Rosenberg, C. A. Coltman, and M. Tubiana, "Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 7, pp. 1630–1636, Nov. 1989.
- [5] J. R. Anderson, J. O. Armitage, and D. D. Weisenburger, "Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.," *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 9, pp. 717–720, July 1998.
- [6] S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, and J. W. Vardiman, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, vol. 2. pp. 220 - 227. Lyon: IARC Press, 2008.
- [7] M. Federico, M. D. Caballero Barrigón, L. Marcheselli, V. Tarantino, M. Manni, C. Sarkozy, S. Alonso-Álvarez, M. Wondergem, G. Cartron, A. López-Guillermo, D. Issa, F. Morschhauser, M. Alcoceba, E. Kimby, C. Rusconi, M. Chamuleau, H. Holte, S. Lockmer, S. Montoto, M. Gomes da Silva, I. Aurer, E. Zucca, E. Paszkiewicz-Kozik, C. Minoia, T. Skrypets, Y. N. Blaker, G. Salles, and B. Coiffier, "Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis.," *The Lancet. Haematology*, vol. 5, pp. 359–367, Aug. 2018.

- [8] B. E. Wahlin, O. E. Yri, E. Kimby, H. Holte, J. Delabie, E. B. Smeland, C. Sundström, B. Christensson, and B. Sander, "Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times," *British Journal of Haematology*, vol. 156, pp. 225–233, Jan. 2012.
- [9] J. J. Yunis, M. M. Oken, M. E. Kaplan, K. M. Ensrud, R. R. Howe, and A. Theologides, "Distinctive Chromosomal Abnormalities in Histologic Subtypes of Non-Hodgkin's Lymphoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 307, pp. 1231–1236, Nov. 1982.
- [10] Y. Tsujimoto, J. Gorham, J. Cossman, E. Jaffé, and C. M. Croce, "The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 229, pp. 1390–1393, Sept. 1985.
- [11] W. B. Graninger, M. Seto, B. Boutain, P. Goldman, and S. J. Korsmeyer, "Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 80, pp. 1512–1515, Nov. 1987.
- [12] L. M. Weiss, R. A. Warnke, J. Sklar, and M. L. Cleary, "Molecular Analysis of the T(14;18) Chromosomal Translocation in Malignant Lymphomas," *New England Journal of Medicine*, vol. 317, pp. 1185–1189, Nov. 1987.
- [13] T. J. McDonnell, N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn, and S. J. Korsmeyer, "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation.," *Cell*, vol. 57, pp. 79–88, Apr. 1989.
- [14] J. Limpens, R. Stad, C. Vos, C. de Vlaam, D. de Jong, G. J. van Ommen, E. Schuurings, and P. M. Kluin, "Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals.," *Blood*, vol. 85, pp. 2528–2536, May 1995.
- [15] G. Dölken, G. Illerhaus, C. Hirt, and R. Mertelsmann, "BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 14, pp. 1333–1344, Apr. 1996.
- [16] S. Roulland, R. S. Kelly, E. Morgado, S. Sungalee, P. Solal-Céligny, P. Colombat, N. Jouve, D. Palli, V. Pala, R. Tumino, S. Panico, C. Sacerdote, J. R. Quirós, C. A. Gonzáles, M.-J. Sánchez, M. Dorronsoro, C. Navarro, A. Barricarte, A. Tjønneland, A. Olsen, K. Overvad, F. Canzian, R. Kaaks, H. Boeing, D. Drognan, A. Nieters, F. Clavel-Chapelon, A. Trichopoulos, D. Trichopoulos, P. Lagiou, H. B. Bueno-de Mesquita, P. H. M. Peeters, R. Vermeulen, G. Hallmans, B. Melin, S. Borgquist, J. Carlson, E. Lund, E. Weiderpass, K.-T. Khaw,

- N. Wareham, T. J. Key, R. C. Travis, P. Ferrari, I. Romieu, E. Riboli, G. Salles, P. Vineis, and B. Nadel, “t(14;18) Translocation: A Predictive Blood Biomarker for Follicular Lymphoma,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 32, pp. 1347–1355, Sept. 2016.
- [17] R. D. Gascoyne, B. Nadel, L. Pasqualucci, J. Fitzgibbon, J. E. Payton, A. Melnick, O. Weigert, K. Tarte, J. G. Gribben, J. W. Friedberg, J. F. Seymour, F. Cavalli, and E. Zucca, “Follicular lymphoma: State-of-the-art ICML workshop in Lugano 2015.,” *Hematological oncology*, vol. 35, pp. 397–407, Dec. 2017.
- [18] B. S. Kahl and D. T. Yang, “Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies,” *Blood*, vol. 127, pp. 2055–2063, Apr. 2016.
- [19] O. Weigert and D. M. Weinstock, “The promises and challenges of using gene mutations for patient stratification in follicular lymphoma.,” *Blood*, vol. 130, pp. 1491–1498, Sept. 2017.
- [20] D. W. Scott and R. D. Gascoyne, “The tumour microenvironment in B cell lymphomas,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 14, pp. 517–534, July 2014.
- [21] S. S. Dave, G. Wright, B. Tan, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, W. C. Chan, R. I. Fisher, R. M. Braziel, L. M. Rimsza, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, J. M. Connors, P. M. Lansdorp, Q. Ouyang, T. A. Lister, A. J. Davies, A. J. Norton, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, E. Campo, E. Montserrat, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, L. Yang, J. Powell, H. Zhao, N. Goldschmidt, M. Chiorazzi, and L. M. Staudt, “Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells.,” *The New England journal of medicine*, vol. 351, pp. 2159–2169, Nov. 2004.
- [22] S. Huet, B. Tesson, J.-P. Jais, A. L. Feldman, L. Magnano, E. Thomas, A. Traverse-Glehen, B. Albaud, M. Carrère, L. Xerri, S. M. Ansell, L. Baseggio, C. Reyes, K. Tarte, S. Boyault, C. Haioun, B. K. Link, P. Feugier, A. López-Guillermo, H. Tilly, P. Brice, S. Hayette, F. Jardin, F. Offner, P. Sujobert, D. Gentien, A. Viari, E. Campo, J. R. Cerhan, and G. Salles, “A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts.,” *The Lancet. Oncology*, vol. 19, pp. 549–561, Apr. 2018.
- [23] B. Deepak, J. A. Hildebrand, S. Stolz, S. Haebe, S. Alig, C. Trevisani, F. Osorio-Barrios, M. D. Bartoschek, M. Mentz, A. Pastore, E. Gaitsch, M. Heide, V. Jurinovic, K. Rautter, J. Gunawardana, M. Sabdia, M. Szczepanowski, J. Richter, W. Klapper, A. Louissaint, C. Ludwig,

- S. Bultmann, H. Leonhardt, S. Eustermann, K.-P. Hopfner, W. Hiddemann, M. Von Bergwelt, C. Steidl, R. Kridel, J. W. Tobin, M. K. Gandhi, D. M. Weinstock, M. Schmidt-Supprian, M. Sárosi, M. Rudelius, V. Passerini, J. Mautner, and O. Weigert, “Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma,” *Cell Reports*, vol. 31, May 2020.
- [24] M. R. Green, S. Kihira, C. L. Liu, R. V. Nair, R. Salari, A. J. Gentles, J. Irish, H. Stehr, C. Vicente-Dueñas, I. Romero-Camarero, I. Sanchez-Garcia, S. K. Plevritis, D. A. Arber, S. Batzoglou, R. Levy, and A. A. Alizadeh, “Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, pp. 1116–1125, Mar. 2015.
- [25] Y. Jiang, A. Ortega-Molina, H. Geng, H.-Y. Ying, K. Hatzi, S. Parsa, D. McNally, L. Wang, A. S. Doane, X. Agirre, M. Teater, C. Meydan, Z. Li, D. Poloway, S. Wang, D. Ennishi, D. W. Scott, K. R. Stengel, J. E. Kranz, E. Holson, S. Sharma, J. W. Young, C.-S. Chu, R. G. Roeder, R. Shaknovich, S. W. Hiebert, R. D. Gascoyne, W. Tam, O. Elemento, H.-G. Wendel, and A. M. Melnick, “CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas.,” *Cancer Discovery*, vol. 7, pp. 38–53, Jan. 2017.
- [26] D. Ennishi, K. Takata, W. Béguelin, G. Duns, A. Mottok, P. Farinha, A. Bashashati, S. Sabeti, M. Boyle, B. Meissner, S. Ben-Neriah, B. W. Woolcock, A. Telenius, D. Lai, M. Teater, R. Kridel, K. J. Savage, L. H. Sehn, R. D. Morin, M. A. Marra, S. P. Shah, J. M. Connors, R. D. Gascoyne, D. W. Scott, A. M. Melnick, and C. Steidl, “Molecular and Genetic Characterization of MHC Deficiency Identifies EZH2 as Therapeutic Target for Enhancing Immune Recognition.,” *Cancer Discovery*, vol. 9, pp. 546–563, Apr. 2019.
- [27] M. Challa-Malladi, Y. K. Lieu, O. Califano, A. B. Holmes, G. Bhagat, V. V. Murty, D. Dominguez-Sola, L. Pasqualucci, and R. Dalla-Favera, “Combined genetic inactivation of  $\beta$ 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma.,” *Cancer cell*, vol. 20, pp. 728–740, Dec. 2011.
- [28] W. Hiddemann and B. D. Cheson, “How we manage follicular lymphoma.,” *Leukemia*, vol. 28, pp. 1388–1395, July 2014.
- [29] M. Dreyling, M. Ghielmini, S. Rule, G. Salles, U. Vitolo, and M. Ladetto, “Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 27, pp. 83–90, Sept. 2016.

- [30] M. Ladetto, F. De Marco, F. Benedetti, U. Vitolo, C. Patti, A. Rambaldi, A. Pulsoni, M. Musso, A. M. Liberati, A. Olivieri, A. Gallamini, E. Pogliani, D. R. Scalabrini, V. Callea, F. Di Raimondo, V. Pavone, A. Tucci, S. Cortelazzo, A. Levis, M. Boccadoro, I. Majolino, A. Pileri, A. M. Gianni, R. Passera, P. Corradini, and C. Tarella, "Prospective, multicenter randomized GITMO/IIL trial comparing intensive (R-HDS) versus conventional (CHOP-R) chemoimmunotherapy in high-risk follicular lymphoma at diagnosis: the superior disease control of R-HDS does not translate into an overall survival advantage," *Blood*, vol. 111, pp. 4004–4013, Apr. 2008.
- [31] F. A. Morschhauser, G. Cartron, C. Thieblemont, P. Solal-Céligny, C. Haioun, R. Bouabdallah, P. Feugier, K. Bouabdallah, E. Asikanius, G. Lei, M. Wenger, E. Wassner-Fritsch, and G. A. Salles, "Obinutuzumab (GA101) monotherapy in relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma or mantle-cell lymphoma: results from the phase II GAUGUIN study.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 31, pp. 2912–2919, Aug. 2013.
- [32] A. K. Gopal, B. S. Kahl, S. de Vos, N. D. Wagner-Johnston, S. J. Schuster, W. J. Jurczak, I. W. Flinn, C. R. Flowers, P. Martin, A. Viardot, K. A. Blum, A. H. Goy, A. J. Davies, P. L. Zinzani, M. Dreyling, D. Johnson, L. L. Miller, L. Holes, D. Li, R. D. Dansey, W. R. Godfrey, and G. A. Salles, "PI3K $\delta$  Inhibition by Idelalisib in Patients with Relapsed Indolent Lymphoma," *New England Journal of Medicine*, vol. 370, pp. 1008–1018, Mar. 2014.
- [33] R. H. Advani, J. J. Buggy, J. P. Sharman, S. M. Smith, T. E. Boyd, B. Grant, K. S. Kolibaba, R. R. Furman, S. Rodriguez, B. Y. Chang, J. Sukbuntherng, R. Izumi, A. Hamdy, E. Hedrick, and N. H. Fowler, "Bcr tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 31, pp. 88–94, Jan. 2013.
- [34] D. Tan, S. J. Horning, R. T. Hoppe, R. Levy, S. A. Rosenberg, B. M. Sigal, R. A. Warnke, Y. Natkunam, S. S. Han, A. Yuen, S. K. Plevritis, and R. H. Advani, "Improvements in observed and relative survival in follicular grade 1-2 lymphoma during 4 decades: the Stanford University experience," *Blood*, vol. 122, pp. 981–987, Aug. 2013.
- [35] C. Casulo, M. Byrtek, K. L. Dawson, X. Zhou, C. M. Farber, C. R. Flowers, J. D. Hainsworth, M. J. Maurer, J. R. Cerhan, B. K. Link, A. D. Zelenetz, and J. W. Friedberg, "Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 33, pp. 2516–2522, Aug. 2015.

- [36] P. Solal-Céligny, P. Roy, P. Colombat, J. White, J. O. Armitage, R. Arranz-Saez, W. Y. Au, M. Bellei, P. Brice, D. Caballero, B. Coiffier, E. Conde-Garcia, C. Doyen, M. Federico, R. I. Fisher, J. F. Garcia-Conde, C. Guglielmi, A. Hagenbeek, C. Haioun, M. LeBlanc, A. T. Lister, A. López-Guillermo, P. McLaughlin, N. Milpied, P. Morel, N. Mounier, S. J. Proctor, A. Rohatiner, P. Smith, P. Soubeyran, H. Tilly, U. Vitolo, P. L. Zinzani, E. Zucca, and E. Montserrat, “Follicular Lymphoma International Prognostic Index,” *Blood*, vol. 104, pp. 1258–1265, Sept. 2004.
- [37] M. Federico, M. Bellei, L. Marcheselli, S. Luminari, A. López-Guillermo, U. Vitolo, B. Pro, S. Pileri, A. Pulsoni, P. Soubeyran, S. Cortelazzo, G. Martinelli, M. Martelli, L. Rigacci, L. Arcaini, F. Di Raimondo, F. Merli, E. Sabattini, P. McLaughlin, and P. Solal-Céligny, “Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project,” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 27, pp. 4555–4562, Sept. 2009.
- [38] E. Bachy, M. J. Maurer, T. M. Habermann, B. Gelas-Dore, D. Maucort-Boulch, J. A. Estell, E. Van den Neste, R. Bouabdallah, E. Gyan, A. L. Feldman, J. Bargay, A. Delmer, S. L. Slager, M. Gomes da Silva, O. Fitoussi, D. Belada, H. Maisonneuve, T. Intragumtornchai, S. M. Ansell, T. Lamy, P. Dartigues, B. K. Link, J. F. Seymour, J. R. Cerhan, and G. Salles, “A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy,” *Blood*, vol. 132, pp. 49–58, July 2018.
- [39] A. Pastore, V. Jurinovic, R. Kridel, E. Hoster, A. M. Staiger, M. Szczepanowski, C. Pott, N. Kopp, M. Murakami, H. Horn, E. Leich, A. A. Moccia, A. Mottok, A. Sunkavalli, P. Van Hummelen, M. Ducar, D. Ennishi, H. P. Shulha, C. Hother, J. M. Connors, L. H. Sehn, M. Dreyling, D. Neuberg, P. Möller, A. C. Feller, M. L. Hansmann, H. Stein, A. Rosenwald, G. Ott, W. Klapper, M. Unterhalt, W. Hiddemann, R. D. Gascoyne, D. M. Weinstock, and O. Weigert, “Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry,” *Lancet Oncology*, vol. 16, pp. 1111–1122, Aug. 2015.
- [40] O. Weigert, N. Kopp, A. A. Lane, A. Yoda, S. E. Dahlberg, D. Neuberg, A. Y. Bahar, B. Chapuy, J. L. Kutok, J. A. Longtine, F. C. Kuo, T. Haley, M. Salois, T. J. Sullivan, D. C. Fisher, E. A. Fox, S. J. Rodig, J. H. Antin, and D. M. Weinstock, “Molecular ontogeny of donor-derived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation,” *Cancer Discovery*, vol. 2, pp. 47–55, Jan. 2012.

- [41] G. P. Shi, A. C. Webb, K. E. Foster, J. H. Knoll, C. A. Lemere, J. S. Munger, and H. A. Chapman, "Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, pp. 11530–11536, Apr. 1994.
- [42] S. Conus and H.-U. Simon, "Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses," *Biochemical pharmacology*, vol. 76, pp. 1374–1382, Dec. 2008.
- [43] F. Lecaille, J. Kaleta, and D. Brömme, "Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design," *Chem. Rev.*, vol. 102, pp. 4459–4488, Dec. 2002.
- [44] R. D. A. Wilkinson, R. Williams, C. J. Scott, and R. E. Burden, "Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential.," *Biological chemistry*, vol. 396, pp. 867–882, Aug. 2015.
- [45] O. Vasiljeva, M. Dolinar, J. R. Pungercar, V. Turk, and B. Turk, "Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans.," *FEBS Letters*, vol. 579, pp. 1285–1290, Feb. 2005.
- [46] B. Turk, D. Turk, and V. Turk, "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, vol. 1477, pp. 98–111, Feb. 2000.
- [47] V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, and D. Turk, "Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, vol. 1824, pp. 68–88, Jan. 2012.
- [48] H. Kirschke, B. Wiederanders, D. Brömme, and A. Rinne, "Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins.," *The Biochemical journal*, vol. 264, pp. 467–473, Dec. 1989.
- [49] B. Turk, J. G. Bieth, I. Björk, I. Dolenc, D. Turk, N. Cimerman, J. Kos, A. Čolič, V. Stoka, and V. Turk, "Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins," *Biological chemistry*, vol. 376, pp. 225–230, Apr. 1995.
- [50] G. P. Shi, J. S. Munger, J. P. Meara, D. H. Rich, and H. A. Chapman, "Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, pp. 7258–7262, Apr. 1992.
- [51] D. Turk, G. Guncar, M. Podobnik, and B. Turk, "Revised Definition of Substrate Binding Sites of Papain-Like Cysteine Proteases," *Biological chemistry*, vol. 379, pp. 137–147, Feb. 1998.

- [52] Y. Choe, F. Leonetti, D. C. Greenbaum, F. Lecaille, M. Bogyo, D. Brömme, J. A. Ellman, and C. S. Craik, “Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, pp. 12824–12832, May 2006.
- [53] R. J. Riese, P. R. Wolf, D. Brömme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman, “Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II–Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading,” *Immunity*, vol. 4, pp. 357–366, Apr. 1996.
- [54] G.-P. Shi, J. A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K. J. Haley, R. Riese, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman, “Cathepsin S Required for Normal MHC Class II Peptide Loading and Germinal Center Development,” *Immunity*, vol. 10, pp. 197–206, Feb. 1999.
- [55] F. Matsumoto, S.-I. Saitoh, R. Fukui, T. Kobayashi, N. Tanimura, K. Konno, Y. Kusumoto, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake, “Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 367, pp. 693–699, Mar. 2008.
- [56] G. Droga-Mazovec, L. Bojic, A. Petelin, S. Ivanova, R. Romih, U. Repnik, G. Salvesen, V. Stoka, V. Turk, and B. Turk, “Cysteine Cathepsins Trigger Caspase-dependent Cell Death through Cleavage of Bid and Antiapoptotic Bcl-2 Homologues,” *The Journal Of Biological Chemistry*, vol. 283, pp. 19140–19150, July 2008.
- [57] M. Fonović and B. Turk, “Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1840, pp. 2560–2570, Aug. 2014.
- [58] T. Flannery, S. McQuaid, C. McGoohan, R. S. McConnell, G. McGregor, M. Mirakhur, P. Hamilton, J. Diamond, G. Cran, B. Walker, C. Scott, L. Martin, D. Ellison, C. Patel, C. Nicholson, D. Mendelow, D. McCormick, and P. G. Johnston, “Cathepsin S expression: An independent prognostic factor in glioblastoma tumours—a pilot study,” *International Journal of Cancer*, vol. 119, no. 4, pp. 854–860, 2006.
- [59] L. Sevenich, R. L. Bowman, S. D. Mason, D. F. Quail, F. Rapaport, B. T. Elie, E. Brogi, P. K. Brastianos, W. C. Hahn, L. J. Holsinger, J. Massagué, C. S. Leslie, and J. A. Joyce, “Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S,” *Nature Cell Biology*, vol. 16, pp. 876–888, Sept. 2014.
- [60] V. Gocheva, W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan, and J. A. Joyce, “Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis.,” *Genes & Development*, vol. 20, pp. 543–556, Mar. 2006.

- [61] T. Rückrich, J. Brandenburg, A. Cansier, M. Müller, S. Stevanović, K. Schilling, B. Wiederanders, A. Beck, A. Melms, M. Reich, C. Driessen, and H. Kalbacher, “Specificity of human cathepsin S determined by processing of peptide substrates and MHC class II-associated invariant chain.,” *Biological chemistry*, vol. 387, pp. 1503–1511, Oct. 2006.
- [62] K. Honey and A. Y. Rudensky, “Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation.,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 3, pp. 472–482, June 2003.
- [63] E. E. Sercarz and E. Maverakis, “MHC-guided processing: binding of large antigen fragments,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 3, pp. 621–629, Aug. 2003.
- [64] P. A. Roche and P. Cresswell, “Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding,” *Nature*, vol. 345, pp. 615–618, June 1990.
- [65] L. Teyton, D. O. Sullivan, P. W. Dickson, V. Lotteau, A. Sette, P. Fink, and P. A. Peterson, “Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways,” *Nature*, vol. 348, pp. 39–44, Nov. 1990.
- [66] J. M. Riberdy, J. R. Newcomb, M. J. Surman, J. A. Barbosat, and P. Cresswell, “HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides,” *Nature*, vol. 360, pp. 474–477, Dec. 1992.
- [67] V. Lotteau, L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson, “Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain.,” *Nature*, vol. 348, pp. 600–605, Dec. 1990.
- [68] M. A. Marić, M. D. Taylor, and J. S. Blum, “Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, pp. 2171–2175, Mar. 1994.
- [69] C. Driessen, R. A. Bryant, A. M. Lennon-Duménil, J. A. Villadangos, P. W. Bryant, G. P. Shi, H. A. Chapman, and H. L. Ploegh, “Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells.,” *The Journal of cell biology*, vol. 147, pp. 775–790, Nov. 1999.
- [70] L. K. Denzin and P. Cresswell, “HLA-DM induces clip dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading,” *Cell*, vol. 82, pp. 155–165, July 1995.
- [71] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang, “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system,” *Nature protocols*, vol. 8, pp. 2281–2308, Oct. 2013.

- [72] C. T. Rueden, J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, and K. W. Eliceiri, “ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data.,” *BMC bioinformatics*, vol. 18, p. 529, Nov. 2017.
- [73] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath, “CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 315, pp. 1709–1712, Mar. 2007.
- [74] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, “A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 337, pp. 816–821, Aug. 2012.
- [75] L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang, “Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 339, pp. 819–823, Feb. 2013.
- [76] B. der LMU Department Biologie II Human Biology Bioimaging, “Protocol for Rapid and Versatile Genome Engineering Using The MIN (Multifunctional Integrase) Strategy,” tech. rep., LMU, Munich, May 2015.
- [77] L. B. Alexandrov, S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. J. R. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A.-L. Børresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjörd, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilicic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jäger, D. T. W. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. López-Otín, S. Martin, N. C. Munshi, H. Nakamura, P. A. Northcott, M. Pajic, E. Papaemmanuil, A. Paradiso, J. V. Pearson, X. S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A. L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T. N. Schumacher, P. N. Span, J. W. Teague, Y. Totoki, A. N. J. Tutt, R. Valdés-Mas, M. M. van Buuren, L. van t Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, J. Zucman-Rossi, P. A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S. M. Grimmond, R. Siebert, E. Campo, T. Shibata, S. M. Pfister, P. J. Campbell, and M. R. Stratton, “Signatures of mutational processes in human cancer,” *Nature*, vol. 500, pp. 415–421, Aug. 2013.
- [78] J. G. Tate, S. Bamford, H. C. Jubb, Z. Sondka, D. M. Beare, N. Bindal, H. Boutselakis, C. G. Cole, C. Creatore, E. Dawson, P. Fish, B. Harsha, C. Hathaway, S. C. Jupe, C. Y. Kok, K. Noble, L. Ponting, C. C. Ramshaw, C. E. Rye, H. E. Speedy, R. Stefancsik, S. L. Thompson, S. Wang, S. Ward, P. J. Campbell, and S. A. Forbes, “COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer.,” *Nucleic Acids Research*, vol. 47, pp. 941–947, Jan. 2019.

- [79] T. Melchardt, C. Hufnagl, D. M. Weinstock, N. Kopp, D. Neureiter, W. Tränkenschuh, H. Hackl, L. Weiss, G. Rinnerthaler, T. N. Hartmann, R. Greil, O. Weigert, and A. Egle, “Clonal evolution in relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma is characterized by high dynamics of subclones,” *Oncotarget*, vol. 7, pp. 51494–51502, Aug. 2016.
- [80] V. T. Chu, T. Weber, B. Wefers, W. Wurst, S. Sander, K. Rajewsky, and R. Kühn, “Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells,” *Nature biotechnology*, vol. 33, pp. 543–548, May 2015.
- [81] N. M. Gaudelli, A. C. Komor, H. A. Rees, M. S. Packer, A. H. Badran, D. I. Bryson, and D. R. Liu, “Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage,” *Nature*, vol. 551, pp. 464–471, Nov. 2017.
- [82] O. Quraishi and A. C. Storer, “Identification of internal autoproteolytic cleavage sites within the prosegments of recombinant procathepsin B and procathepsin S. Contribution of a plausible unimolecular autoproteolytic event for the processing of zymogens belonging to the papain family,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 8118–8124, Mar. 2001.
- [83] H. C. Jubb, H. K. Saini, M. L. Verdonk, and S. A. Forbes, “COSMIC-3D provides structural perspectives on cancer genetics for drug discovery,” *Nature Genetics*, vol. 50, pp. 1200–1202, Sept. 2018.
- [84] M. Dyer, P. Fischer, E. Nacheva, W. Labastide, and A. Karpas, “A new human B-cell non-Hodgkin’s lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14; 18) and t(4; 11) chromosomal translocations,” *Blood*, vol. 75, pp. 709–714, Feb. 1990.
- [85] S. J. Kim, S. Schätzle, S. S. Ahmed, W. Haap, S. H. Jang, P. K. Gregersen, G. Georgiou, and B. Diamond, “Increased cathepsin S in Prdm1<sup>-/-</sup> dendritic cells alters the TFH cell repertoire and contributes to lupus,” *Nature Immunology*, vol. 18, pp. 1016–1024, Sept. 2017.
- [86] L. Pasqualucci, M. Compagno, J. Houldsworth, S. Monti, A. Grunn, S. V. Nandula, J. C. Aster, V. V. Murty, M. A. Shipp, and R. Dalla-Favera, “Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, pp. 311–317, Feb. 2006.
- [87] V. S. Lestou, R. D. Gascoyne, C. Salski, J. M. Connors, and D. E. Horsman, “Uncovering novel inter- and intrachromosomal chromosome 1 aberrations in follicular lymphomas by using an innovative multicolor banding technique,” *Genes, Chromosomes and Cancer*, vol. 34, pp. 201–210, June 2002.

- [88] J. Barretina, G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin, S. Kim, C. J. Wilson, J. Lehár, G. V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, L. Murray, M. F. Berger, J. E. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jané-Valbuena, F. A. Mapa, J. Thibault, E. Bric-Furlong, P. Raman, A. Shipway, I. H. Engels, J. Cheng, G. K. Yu, J. Yu, P. Aspesi, M. de Silva, K. Jagtap, M. D. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palesscandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R. C. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Winckler, M. Reich, N. Li, J. P. Mesirov, S. B. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V. E. Myer, B. L. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J. L. Harris, M. Meyerson, T. R. Golub, M. P. Morrissey, W. R. Sellers, R. Schlegel, and L. A. Garraway, “The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity,” *Nature*, vol. 483, pp. 603–607, Mar. 2012.
- [89] H. Bergmann, M. Yabas, A. Short, L. Miosge, N. Barthel, C. E. Teh, C. M. Roots, K. R. Bull, Y. Jeelall, K. Horikawa, B. Whittle, B. Balakishnan, G. Sjollem, E. M. Bertram, F. Mackay, A. J. Rimmer, R. J. Cornall, M. A. Field, T. D. Andrews, C. C. Goodnow, and A. Enders, “B cell survival, surface BCR and BAFFR expression, CD74 metabolism, and CD8- dendritic cells require the intramembrane endopeptidase SPPL2A.,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 210, pp. 31–40, Jan. 2013.
- [90] A. M. Lee, A. J. Clear, M. Calaminici, A. J. Davies, S. Jordan, F. MacDougall, J. Matthews, A. J. Norton, J. G. Gribben, T. A. Lister, and L. K. Goff, “Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome.,” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 24, pp. 5052–5059, Nov. 2006.
- [91] R. J. Youle and A. Strasser, “The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death.,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 9, pp. 47–59, Jan. 2008.
- [92] C. C. Lee, A. M. Avalos, and H. L. Ploegh, “Accessory molecules for Toll-like receptors and their function,” *Nature Publishing Group*, vol. 12, pp. 168–179, Feb. 2012.
- [93] S. E. Ewald, A. Engel, J. Lee, M. Wang, M. Bogyo, and G. M. Barton, “Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase.,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 208, pp. 643–651, Apr. 2011.
- [94] B. Park, M. M. Brinkmann, E. Spooner, C. C. Lee, Y.-M. Kim, and H. L. Ploegh, “Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9,” *Nature Immunology*, vol. 9, pp. 1407–1414, Oct. 2008.

- [95] E. Latz, A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock, "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.," *Nature Immunology*, vol. 5, pp. 190–198, Feb. 2004.
- [96] S. E. Ewald, B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman, and G. M. Barton, "The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor," *Nature*, vol. 456, pp. 658–662, Sept. 2008.
- [97] J. D. Phelan, R. M. Young, D. E. Webster, S. Roulland, G. W. Wright, M. Kasbekar, A. L. Shaffer, M. Ceribelli, J. Q. Wang, R. Schmitz, M. Nakagawa, E. Bachy, D. W. Huang, Y. Ji, L. Chen, Y. Yang, H. Zhao, X. Yu, W. Xu, M. M. Palisoc, R. R. Valadez, T. Davies-Hill, W. H. Wilson, W. C. Chan, E. S. Jaffe, R. D. Gascoyne, E. Campo, A. Rosenwald, G. Ott, J. Delabie, L. M. Rimsza, F. J. Rodriguez, F. Estephan, M. Holdhoff, M. J. Kruhlak, S. M. Hewitt, C. J. Thomas, S. Pittaluga, T. Oellerich, and L. M. Staudt, "A multiprotein super-complex controlling oncogenic signalling in lymphoma," *Nature*, vol. 560, pp. 387–391, Aug. 2018.
- [98] M. M. Mohamed and B. F. Sloane, "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer.," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, pp. 764–775, Oct. 2006.
- [99] T. Flannery, D. Gibson, M. Mirakhur, S. McQuaid, C. Greenan, A. Trimble, B. Walker, D. McCormick, and P. G. Johnston, "The clinical significance of cathepsin S expression in human astrocytomas.," *The American journal of pathology*, vol. 163, pp. 175–182, July 2003.
- [100] B. Wang, J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H. A. Chapman, R. Kalluri, and G.-P. Shi, "Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, pp. 6020–6029, Mar. 2006.
- [101] Q. Fan, X. Wang, H. Zhang, C. Li, J. Fan, and J. Xu, "Silencing cathepsin S gene expression inhibits growth, invasion and angiogenesis of human hepatocellular carcinoma in vitro.," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 425, pp. 703–710, Sept. 2012.
- [102] C. Palermo and J. A. Joyce, "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer.," *Trends in pharmacological sciences*, vol. 29, pp. 22–28, Jan. 2008.

### **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Weigert für die Überlassung des Themas, die sehr engagierte und jederzeit überaus konstruktive Unterstützung und die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizontes. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. hum. biol. Deepak Bararia, welcher mich bei den ersten Schritten im Labor unterstützte und eng begleitete. Weiterhin möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG Weigert und AG Bultmann bedanken, welche mich in allen wissenschaftlichen und experimentellen Fragen jederzeit und mit viel Geduld berieten.

Ein ganz besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie und meinen Freunden, welche mich immer unterstützt haben. Ohne sie wäre meine Forschung nicht möglich gewesen.

Vielen Dank.