

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Johannes Adrian Rowen Hildebrand

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Bassermann

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Marc Schmidt-Supprian
2. apl. Prof. Dr. Arnd Kieser
3. Prof. Dr. Björn Chapuy

Die Dissertation wurde am 14.02.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2023 angenommen.

(i) Inhalt

(i) Inhalt	2
(ii) Abstract (English):	5
(iii) Abbildungsverzeichnis	6
(iv) Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 B Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHLs).....	10
1.2 Das Keimzentrum	10
1.3 Follikuläres Lymphom	12
1.4 Das Tumormikromilieu (TME) im FL	13
1.5 Konvergente Evolution von Mutationen im FL	13
1.6 Cathepsin S (CTSS)	14
1.6.1 Aktivierung und katalytische Eigenschaften von CTSS	14
1.6.2 Unterteilung der Cystein-Cathepsine	15
1.6.3 Gewebespezifische Expression von CTSS	15
1.7 CTSS ist an verschiedenen intra- und interzellulären Prozessen beteiligt.....	16
1.7.1 Die Rolle von CTSS bei der Antigenprozessierung und Präsentation	16
1.7.2 Die Rolle von CTSS im Toll-like-receptor (TLR) Signalweg	16
1.7.3 Die extrazelluläre Rolle von CTSS.....	17
1.7.4 Apoptose	18
1.8 Regulation der CTSS-Aktivität	18
1.8.1 Regulation auf Transkriptionsebene	18
1.8.2 Regulation auf Proteinebene	19
1.8.3 Bedeutung von CSTB bei der CTSS Inhibierung.....	20
1.9 Vorarbeiten: CTSS-Mutationen in FL.....	21
2. Zielsetzung der Doktorarbeit	23
3. Material and Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Plasmide	24
3.1.2 Biologische Proben	24
3.1.3 Materialien/Chemikalien.....	24
3.1.4 Zellkulturmedien.....	26
3.1.5 Kunststoffartikel	26
3.1.6 Kommerzielle Assays.....	26
3.1.7 Geräte	26
3.1.8 Puffer.....	27
3.1.9 Gele.....	28
3.1.10 Antikörper.....	28
3.1.11 Enzyme	30
3.1.12 Daten aus Datenbanken	30
3.1.13 Zelllinien	30
3.1.14 Mausmodelle.....	30

3.1.15	Primer.....	30
3.1.16	Software.....	31
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Zellkultur.....	32
3.2.2	Patientendaten.....	32
3.2.3	Klonierung.....	35
3.2.4	Virusproduktion.....	36
3.2.5	Transduktion.....	37
3.2.6	Puromycin-Selektion.....	37
3.2.7	RNA-Isolierung.....	38
3.2.8	Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	38
3.2.9	Synthese Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse.....	38
3.2.10	PCR und Sanger-Sequenzierung von CTSS.....	38
3.2.11	Immunoblotting.....	38
3.2.12	Immunopräzipitation.....	39
3.2.13	Cathepsin-Aktivitätstest.....	39
3.2.14	<i>In vitro</i> Messung der autokatalytischen Umwandlungskinetik von pro-CTSS zu aktivem CTSS.....	40
3.2.15	Herstellung von pro-CTSS, intermediate-CTSS und aktivem CTSS Wildtyp für die proteomische Analyse.....	41
3.2.16	Immunopräzipitation gefolgt von Massenspektrometrie.....	41
3.2.17	BioID2 Proximity-Labeling.....	44
3.2.18	Tumorinokulation und Tierstudien.....	45
3.2.19	Isolierung der Tumore.....	46
3.2.20	Durchflusszytometrie.....	46
3.2.21	Immunhistochemie (IHC).....	47
3.2.22	Berechnungsmethoden für die Molekulardynamik.....	48
3.2.23	Single-cell RNA-seq mit primären Patientenproben.....	49
3.2.24	Quantifizierung und statische Analyse.....	50
3.2.25	Berechnung der nuklearen Translokation von Cathepsinen (NLS).....	50
3.2.26	Verfügbarkeit von Daten und Code.....	50
4.	Ergebnisse.....	51
4.1	Molekulare Mechanismen der Cathepsin S Hyperaktivität.....	51
4.1.1	CTSS-Mutationen bei FL.....	51
4.1.2	Auswirkungen der CTSS ^{Y132D} -Mutation auf die <i>in vitro</i> -Substratspaltungsaktivität.....	52
4.1.3	Einfluss der CTSS ^{Y132D} -Mutation auf die autokatalytische CTSS-Aktivierung.....	54
4.1.4	Molekulare Simulationen und Massenspektrometrie mit CTSS ^{Y132D}	55
4.2	Einfluss von CTSS ^{Y132D} auf die CD74 Prozessierung <i>in vitro</i>	58
4.3	Die Auswirkungen der CTSS-Hyperaktivität auf das Tumorwachstum in immunkompetenten Mäusen.....	59
4.4	Die Auswirkungen der CTSS-Hyperaktivität auf die CD4 ⁺ T Zell-Infiltration und Immunaktivierung.....	61
4.5	Integrierte Analyse von CTSS-Mutationen, Amplifikationen und Genexpression beim FL.....	63
4.6	Einfluss der CTSS-Hyperaktivität auf die Behandlungsergebnisse bei Patienten, die eine Immunchemotherapie erhalten.....	65
4.7	Untersuchung weiterer tumorfördernder Signalwege in CTSS-hyperaktiven Lymphomzellen.....	68

4.7.1	Bestimmung gebundener Interaktionspartner von CTSS unter Verwendung von Co-immunopräzipitation (Co-IP) in Kombination mit Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	68
4.8	Einfluss der Stefin B Expression auf die CTSS-Aktivität in FL	69
4.8.1	Einfluss von CSTB Knockdown auf die Substratspaltungsaktivität von CTSS in Zelllysaten	69
4.8.2	Expressionsmuster von <i>CSTB</i> in single-cell (sc) RNA-seq Daten von Patienten mit FL	71
4.8.3	Therapieansprechen von Lymphomen mit CTSS-Hyperaktivität	73
5.	Diskussion	77
5.1	Molekulare Mechanismen der CTSS-Hyperaktivität	78
5.1.1	Selektionsdruck für <i>CTSS</i> ^{Y132} -Mutationen	78
5.1.2	<i>CTSS</i> ^{Y132} -Mutationen erhöhen die autokatalytische Umwandlung von pro-CTSS zu katalytisch aktivem CTSS	79
5.2	<i>CTSS</i> ^{Y132} -Mutationen erhöhen die CD4 ⁺ T Zell Aktivierung	80
5.3	Einfluss der CTSS-Hyperaktivität auf die Behandlungsergebnisse bei Patienten, die eine Immunchemotherapie erhalten	83
5.4	Der Einfluss und die Bedeutung von erhöhter <i>CSTB</i> -Expression bei FL	84
5.5	Auswirkungen zytosolischer Cathepsin Hyperaktivität	85
5.5.1	Relevanz von Stefin B (<i>CSTB</i>)	85
5.5.2	Auswirkungen auf den Zelltod	86
5.6	Ausblick	87
5.6.1	Identifizierung des Interaktoms von CTSS durch Markierung proximaler Proteine mittels Bio-ID2	87
5.6.2	Auswirkungen von CTSS im Zellkern	89
5.6.3	Ausnutzung therapeutischer Schwachstellen CTSS-hyperaktiver Tumore	92
	Literaturverzeichnis	94
	Anhang	106
	Danksagung	115

(ii) Abstract (English):

Follicular lymphoma (FL) is a common, often incurable, and clinically and molecularly heterogeneous B cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL). The tumour microenvironment (TME) plays an important role in the development and progression of FL and influences the therapeutic outcome. It has become evident that the mutual interactions between FL and the TME support transforming cells to acquire the functional ability to escape and resist cell death, but the specific therapeutic vulnerabilities have not been elucidated. Treatment-resistant cells can cause recurrences and refractory disease and remain a major clinical challenge. Functional characterization of the molecular mechanisms underlying genotype-specific FL-TME interactions could help to better understand clinically relevant therapeutic vulnerabilities.

I functionally characterized a novel, clinically relevant mechanism of lymphoma and TME interaction. Specifically, recurrent *Cathepsin S* (*CTSS*) alterations, i.e., somatic gain-of-function mutations (in about 6% of FL) that caused structural changes of the enzyme or amplification of *CTSS* (in about 13% of FL) resulted in aberrant hyperactivity of this lysosomal cysteine protease and increased the substrate cleavage activity, including CD74. CD74 prevents premature histocompatibility complex class II (MHC class II)-restricted antigen presentation. *CTSS*-hyperactivity induced a tumor-promoting, CD4⁺ T cell-enriched TME *in vivo*. Clinically, patients with *CTSS*-hyperactive FL had lower rates of progression of disease within 24 months (POD24) with standard immunochemotherapies.

To identify the *CTSS* interactome, I performed *CTSS* co-immunoprecipitation followed by mass-spectrometry. I was able to identify the endogenous, cytosolic *CTSS*-inhibitor Stefin B (alias cystatin B, *CSTB*). *CSTB* levels significantly affected the *CTSS*-activity in B-NHL cells. Knock-down of *CSTB* resulted in decreased cell viability in cells that were treated with the detergent LLOMe. LLOMe causes lysosomal membrane permeabilisation (LMP), a process that releases cathepsins like *CTSS* from the lysosome into the cytosol which can result in lysosomal cell death (LCD). I showed that LMP resulted in increased cleavage of apoptosis-regulating BCL2-family members, including MCL1 and BID, and resulted in increased cell death in *CTSS*-hyperactive B-NHL cells. Therefore, LMP-inducing compounds should be evaluated further in the treatment of *CTSS*-hyperactive tumors.

(iii) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Keimzentrumsreaktion.	11
Abbildung 2 Primärstruktur von pro-CTSS mit katalytischer Triade bestehend aus dem nukleophilen (C), der Base (H), und der Säure (N); SP = Signalpeptid, Pro = Prodomäne, AS = Aminosäure.	15
Abbildung 3 Die 2,4 Angström Röntgenkristallstruktur von rekombinantem humanen Stefin B (in Grün) im Komplex mit der Cysteinprotease Papain (in Rot). PDB Nummer = 1STF.	20
Abbildung 4 Zusammenfassung der Aktivierung, der Beteiligung an intra- und interzellulären Prozessen, und der Regulation von CTSS.	21
Abbildung 5 Übersicht über die Patientenproben.	35
Abbildung 6 CTSS-Mutationen bei FL sind rekurrent, meist subklonal und häufen sich am Mutations-Hotspot CTSS ^{Y132}	51
Abbildung 7 CTSS ^{Y132D} -Mutationen sind Gain-of-Function und erhöhen die Aktivität der Substratspaltung.	53
Abbildung 8 Aufgereinigtes CTSS ^{Y132D} besitzt eine höhere Proteaseaktivität als CTSS ^{WT}	55
Abbildung 9 CTSS ^{Y132D} beschleunigt die autokatalytische CTSS-Aktivierung.	57
Abbildung 10 CTSS ^{Y132D} -Mutation erhöht die CD74 Prozessierung <i>in vitro</i>	58
Abbildung 11 Transduktion und <i>in vitro</i> Experimente mit A20 Zellen.	59
Abbildung 12 CTSS Hyperaktivität beschleunigt das Tumorwachstum in immunkompetenten Mäusen.	60
Abbildung 13 Hyperaktive CTSS-Maustumore zeigen eine erhöhte CD4 ⁺ T Zell-Infiltration und Immunaktivierung.	62
Abbildung 14 CTSS-Hyperaktivität in primären Patientenproben aus der GLSG2000-Kohorte.	64
Abbildung 15 CTSS-Hyperaktivität steht in Verbindung mit vermehrter CD4 ⁺ T Zell Infiltraten in diagnostischen FL-Biopsien.	65
Abbildung 16 Der CTSS-Mutations- und Expressionsstatus hat klinische Auswirkungen auf Patienten, die eine Standard-Immunchemotherapie erhalten.	66
Abbildung 17 CTSS-Hyperaktivität in einer unabhängigen Validierungskohorte.	67
Abbildung 18 CTSS-Co-IP gefolgt von LC-MS/MS.	69
Abbildung 19 Stefin B bindet CTSS.	70
Abbildung 20 Gesamt-Cathepsin-Aktivität in Zelllinien mit CSTB Knockdown.	71
Abbildung 21: CSTB-Expression bei FL in sc-RNA-seq Daten.	72
Abbildung 22 CTSS-Hyperaktivität sensitiviert gegenüber LLOMe in B-NHL Zelllinien.	74
Abbildung 23 Die Auswirkung von CTSS-Hyperaktivität auf BCL2 Family Proteine.	75
Tabelle 2 Gegenüberstellung zweier gleichzeitiger Veröffentlichungen (back-to-back Veröffentlichung) zu CTSS Alterationen in FL.	82
Abbildung 24 Modell des Lysosom-vermittelten Zelltods in B-NHL (basierend auf des in Abbildung 23 gezeigten Western Blot).	87
Abbildung 25 Expression und Aktivitätsmessung des BiOLD2-CTSS-Fusionsproteins.	88
Abbildung 26 Identifizierung von nuklearem CTSS in B-NHLs.	91
Anhang 1 CTSS-Strukturmodellierung von CTSS ^{WT} gegenüber CTSS ^{Y132D}	106
Anhang 2 Durch Massenspektroskopie identifizierte Peptidfragmente nach A) tryptischem und B) semi-tryptischen Verdau von aufgereinigtem FLAG-markiertem pro-, int- (rot) und aktivem CTSS.	107
Anhang 3 Untersuchung der Substratschneideaktivität verschiedener Cathepsin-Substrate in Karpas422 Zellen.	108
Anhang 4. Annexin V Assay nach 2-stündiger LLOMe Behandlung.	109
Anhang 5 Plasmid Karte des C-terminalen BiOLD2 Expressionsvektors.	110
Tabelle 3 Auflistung der identifizierten Proteine mittels BiOLD2 unter Verwendung der angegebenen Filter.	111

(iv) Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNG	AUSGESCHRIEBENES WORT
%	Prozent
A	Adenin
Å	Ångström
ADC	Antikörper-Drug-Konjugate
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure (alle AS als Einbuchstabensymbol dargestellt)
BCCA	British Columbia Cancer Agency
BCL2	B Zell Lymphomprotein 2
BCL6	B Zell Lymphomprotein 6
BCR	B Zell-Rezeptor
BID	BH3-Interaktionsdomänen-Todesagonisten-Protein
BioID2	Massenspektrometrie-basierte Markierungsmethoden
BL	Burkitt Lymphom
B-NHL	B Zell Non-Hodgkin Lymphom
BSA	Rinderserumalbumin
Bv	Brilliantviolett
C	Cytosin
CAM	Zell-Zell Kontakt Moleküle
CBs	Zentroblasten
CCF	Krebszellfraktion
CCs	Zentrozyten
CD74	MHC-II-associated invariant chain
CLIP	MHC-II-associated invariant chain peptide
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CN	Kopienzahl
CNV	Kopienzahlvariation
Co-IP	Co-immunopräzipitierung
CST	Cystatin
CSTA	Cystatin A/Stefin A
CSTB	Cystatin B/Stefin B
C-terminus	Carboxy-terminus
CTG	Cell Titer Glo
CTS	Cathepsin
CTSB	Cathepsin B
CTSH	Cathepsin H
CTSS	Cathepsin S
CXCL	Chemokin (C-X-C Motif) Ligand
Cy	Cyanin
dd	bidestilliert
DLBCL	Diffuses großzelliges B Zell Lymphom
DLI	DLI Lymphozyten-Infusionen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EV	Kontrollvektor
FBS	fetales Kälberserum
FDC	Follikuläre Dendritische Zelle
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FFS	Überleben ohne Rezidiv oder tumorbedingten Todesfall
FL	Follikuläres Lymphom
FNA	Feinnadelaspiration
G	Guanin
GC	Keimzentrum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLSG2000	German Low Grade Lymphoma Study Group 2000

H	Histon
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HPF	High-Power-Field
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IHC	immunhistochemie
Int-CTSS	Intermediäres CTSS
ISRE	Interferon-stimuliertes Response-Element
k/d	Knockdown
kD	Kilo-Dalton
KI	Knock-in
KNG	Kininogen
KO	Knock-out
LC-MS/MS	Massenspektrometrie
LCD	Lysosomaler Zelltod
LLOMe	L-Leucyl-L-Leucine Methylester (Hydrochlorid)
LMP	Lysosomale Membran Permeabilisierung
MCL1	Myeloisches Leukämie Zelldifferenzierungsprotein 1
MD	Molekulardynamiksimulationen
MHC-I	MHC-Klasse-I-Komplex
MHC-II	MHC-Klasse-II-Komplex
Min	Minute
MM	Multiples Myelom
Mm	Milimeter
mM	Millimolar
MOMP	Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran
MCS	Multiple-cloning-site
N	Anzahl
NKT	natürliche Killer T Zellen
NK	natürlichen Killerzellen
NLS	Kernlokalisierungssignal
nM	Nanomolar
Ns	Nanosekunden
N-terminus	Amino-terminus
NUP	Nukleoporine
OS	Gesamtüberleben
pBBCs	B Zellen aus peripherem Blut
PE	Phycoerythrin
PerPC	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PLB	passiver Lysepuffer
POD24	Fortschreiten einer Erkrankung innerhalb von 24 Monaten
Pro	Prodomäne
Pro-CTSS	Katalytisch inaktives pro-Cathepsin S
PROTAC	Proteolysis Targeting Chimera
R-CHOP	Rituximab-Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisone
R-CVP	Rituximab-Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisone
RNA	Ribonukleinsäure
scRNA-seq	Einzelzell-RNA-Sequenzierung
SD	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
sh_CSTB	shRNA gegen CSTB
sh_Ctrl	non-targeting shRNA
Sog.	Sogenannt
SP	Signalpeptid
SP1	Zinkfinger-Transkriptionsfaktor 1
SP3	Zinkfinger-Transkriptionsfaktor 3
SRBCs	rote Blutkörperchen vom Schaf
Std	Stunde
Stdn	Stunden
sTLR9	inhibitorisches TLR9
T (ohne Zelle)	Thymidin

tBID	proapoptotischem verkürztes BID
TCR	T Zell Rezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
T _{FH}	T-follikulären Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TME	Tumormikromilieu
T Zelle	Thymus Zelle
U	Uracil
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
VAF	Varianten-Allel-Häufigkeiten
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 B Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHLs)

Non-Hodgkin-Lymphome (NHLs) sind die weltweit häufigsten hämatologischen Erkrankungen und machen fast 3% aller Krebsdiagnosen aus (Bray, Ferlay et al. 2018). Unter den NHLs machen die B Zell NHLs (B-NHLs) den größten Anteil aus. Anhand des klinischen Verlaufs kann man die B-NHLs in aggressive und indolente Lymphome unterteilen. Aggressive Lymphome sind schnell wachsend und sind die häufigsten B-NHLs. Das diffuse großzellige B Zell Lymphom (DLBCL) ist der häufigste aggressive B-NHL-Subtyp. Indolente Lymphome wachsen in der Regel langsamer und weisen bei der Erstdiagnose weniger Anzeichen und Symptome auf. Indolente Subtypen machen etwa 40 Prozent aller B-NHL-Fälle aus. Das FL gehört weltweit zu den häufigsten indolenten Lymphomen, zeigt ein folliculäres Wachstumsmuster und besteht aus Zentrozyten und Zentroblasten. Sowohl das DLBCL als auch das FL sind reifzellige B-NHLs und haben ihren Ursprung im Keimzentrum (Alaggio, Amador et al. 2022).

1.2 Das Keimzentrum

Keimzentren (GC) des lymphoiden Gewebes sind morphologisch abgegrenzte, B Zell reiche Strukturen, die sich in Follikeln der sekundären lymphatischen Organe nach Antigenkontakt von B Zellen bilden. Antigen-aktivierte, hochproliferative B Zellen (Zentroblasten) befinden sich hauptsächlich in der GC-Dunkelzone, wo ihre variablen Immunglobulin-Gene mittels somatischer Hypermutation verändert werden, um über nachfolgende Selektionsprozesse hochaffine B Zell-Rezeptoren (BCR) zu erzeugen. Darauf wandern die B Zellen in die helle GC-Zone, wo sie mit folliculären CD4⁺ Thymus (T) Helfer Zellen (T_{FH}) und folliculären Dendritischen Zellen (FDCs) interagieren (**Abbildung 1**). Diese Interaktionen führen zur Bevorzugung von B Zellen, deren BCR eine hohe Affinität für das jeweilige Antigen hat. B Zellen können für weitere Runden somatischer Hypermutation und Proliferation in die dunkle Zone zurückkehren oder unterliegen der Apoptose und werden dann von Makrophagen umhüllt und verdaut (Aguzzi, Kranich et al. 2014). Diese Prozesse führen zur Selektion von hochaffinen GC-B Zellen, die sich in Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder Memory-B Zellen für zukünftigen Kontakt mit dem gleichen Antigen differenzieren können.

Zum einen erlangen GC-B Zellen in diesen Prozessen gewollte DNA Schäden zur Veränderung ihrer Immunglobuline über Aktivierungsinduzierte-Cytidin-Desaminase (AID)

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Folliculären Lymphom

mittels class switch recombination und somatischer Hypermutation, zum anderen – und auch auf Grund der hohen Proliferationsrate bei gleichzeitig verminderter Zellzykluskontrolle – sind GC-B Zellen besonders gefährdet ungewollte DNA-Schäden anzureichern und somit selektive Vorteile zu erlangen (Muramatsu, Kinoshita et al. 2000, Honjo, Nagaoka et al. 2005, Conticello 2008, Liu, Duke et al. 2008). Diese Prozesse können letztendlich auch die Lymphomentstehung begünstigen (Mlynarczyk, Fontán et al. 2019).

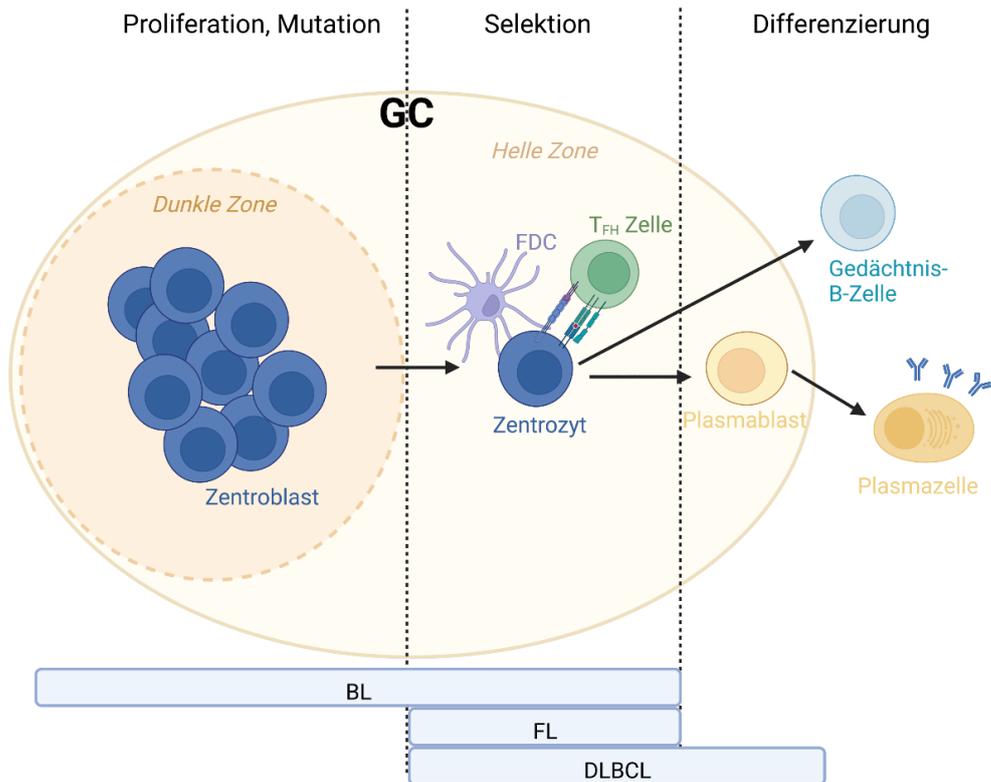


Abbildung 1 Keimzentrumsreaktion.

B Zellen im lymphatischen Follikel bilden ein transientes Zellkompartiment, das als Keimzentrum (GC) bezeichnet wird. Die dunkle Zone des GC wird größtenteils von Zentroblasten gebildet, die sich schnell vermehren und gleichzeitig somatische Hypermutation und class-switch recombination ihrer Immunglobulin-Gene durchlaufen. Die schnelle Vermehrung und klonale Expansion ermöglicht es den Zellen, viele verschiedene Versionen der Immunglobulin-Gene zu erwerben, so dass sie einen B Zell-Rezeptor mit hoher Affinität für das Antigen, gegen das sie gerichtet sind, bilden können. Nach einigen Teilungsrunden können diese B Zellen auf einen heterogeneren Teil des GC treffen, der T folliculäre Helferzellen (T_{FH}) Zellen und follikuläre Dendritische Zellen (FDC) enthält. Die große Anzahl von B Zellen konkurriert um die Interaktion mit der begrenzten Anzahl von T_{FH} Zellen. Die B Zellen, denen es mit Hilfe der T_{FH} / FDC Interaktion gelungen ist, einen BCR mit hoher Affinität zu generieren, können sich entweder zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder hochaffinen Gedächtnis-B Zellen ausdifferenzieren. Einige B Zellen kehren in die dunkle, proliferative Zone zurück und durchlaufen weitere Runden somatischer Hypermutation, um ihre BCRs zu verfeinern. Die überwiegende Mehrheit der Zentrozyten ohne hochaffinen BCR stirbt. Die drei ausgewählten Krankheitsbilder Burkitt Lymphom (BL), Follikuläres Lymphom (FL) und diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) lassen sich den verschiedenen Bereichen des Keimzentrums zuordnen. Angepasst von (Mlynarczyk, Fontán et al. 2019).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Zu den häufigsten GC abgeleiteten Lymphomen gehören das diffuse großzellige B Zell Lymphom (DLBCL), gefolgt vom folliculären Lymphom (FL) und dem seltenen Burkitt Lymphom (BL). Diese drei B-NHL weisen Veränderungen ihrer variablen Immunglobulin-Gene auf, die auf somatische Hypermutation zurückzuführen sind (Küppers, Klein et al. 1999). Außerdem haben sie immunphänotypische, histologische und Genexpressions-Merkmale, die auf eine GC-B Zelle als Ursprungszelle schließen lassen. Von GC abgeleitete Lymphome sind sehr heterogen, was auf die Vielfalt der potentiellen somatischen Mutationen und class-switch recombination der GC-B Zellen, zurückzuführen ist (Attaf, Baaklini et al. 2021). Dank immer besserer Technologien, die einen tieferen Einblick in die genetischen und epigenetischen Merkmale ermöglichen haben sich die Klassifizierungsschemata für diese Tumoren ständig weiterentwickelt (Alaggio, Amador et al. 2022). Bestandteil dieser Doktorarbeit ist das FL, auf das im Folgenden genauer eingegangen wird.

1.3 Follikuläres Lymphom

Auch wenn das FL zu den indolenten Lymphomen gehört, wird es meist erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (advanced stage disease) diagnostiziert und gilt als unheilbar. Eine Subgruppe von FL zeichnet sich außerdem durch ein frühes Fortschreiten der Erkrankung, einen aggressiven klinischen Verlauf, chronische Rezidive, Behandlungsresistenz und eine kurze Gesamtüberlebenszeit aus (Okosun, Bodor et al. 2014, Casulo, Byrtek et al. 2015, Jurinovic, Kridel et al. 2016, Gascoyne, Nadel et al. 2017).

Die meisten Patienten tragen eine t(14;18) Translokation, die anti-apoptotisches *B cell lymphoma 2 (BCL2)* unter die Regulation des in B Zellen aktivierten Transkriptionenhancers von *immunoglobulin heavy chain (IGH)* bringt, was zu einer Überexpression von BCL2 führt (Rabkin, Hirt et al. 2008, Kridel, Sehn et al. 2012). Die Überexpression von BCL2 allein ist normalerweise nicht genug für die maligne Transformation von B Zellen (Kridel, Sehn et al. 2012). Allerdings können B Zellen mit erhöhtem BCL2 Level länger überleben und haben somit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit weitere genetische Veränderungen für eine maligne Transformation anzureichern (Kridel, Sehn et al. 2012). Weitere rekurrente Genmutationen sind häufig und haben wahrscheinlich einen deutlichen Einfluss auf die Biologie und den klinischen Verlauf der Krankheit (O'Shea, O'Riain et al. 2008, Pastore, Jurinovic et al. 2015, Weigert and Weinstock 2017).

Gegenstand aktueller Forschung ist es, die Auswirkungen dieser zusätzlichen molekularen Veränderungen immer detaillierter zu untersuchen (Swerdlow, Campo et al. 2016). Tatsächlich hat unsere Arbeitsgruppe zeigen können, dass die Integration von

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Genmutationen die Risikostratifizierung bei Patienten mit fortgeschrittenem FL und Therapiebedarf (meist bestehend aus: Rituximab (R) in Kombination mit entweder Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisone (R-CHOP) oder mit Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisone (R-CVP)) signifikant verbessert (Pastore, Jurinovic et al. 2015, Jurinovic, Kridel et al. 2016). Zusätzlich zu den zellintrinsic Veränderungen haben auch Immunzellen und Signale des immunologischen Tumormikromilieus (TME) einen Einfluss auf das Behandlungsergebnis (Dave, Wright et al. 2004, Glas, Knoops et al. 2007, Kiaii, Clear et al. 2013, Hellmuth, Louissaint et al. 2018, Huet, Tesson et al. 2018, Mondello, Tadros et al. 2020). Es ist zu erwarten, dass ein besseres funktionelles Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorzellen und ihrer Interaktionen, die Grundlage für individualisierte und molekular zielgerichtete, hochwirksame und gut verträgliche Therapien bilden wird.

1.4 Das Tumormikromilieu (TME) im FL

Wir wissen seit vielen Jahren, dass primäre FL Zellen *ex vivo* und *in vivo* nicht propagiert werden können (Johnson, Watt et al. 1993). Seither wird zunehmend erkannt, dass Tumorzellen auch von den Interaktionen mit nicht-malignen Zellen des TME abhängig sind (Binnewies, Roberts et al. 2018). FL entwickelt sich aus den GC des lymphoiden Gewebes und gilt als prototypisches Beispiel für eine Erkrankung mit starker Abhängigkeit vom TME (Kridel, Sehn et al. 2012). Das TME ist ein komplexes Mikromilieu, das u.a. aus Fibroblasten, Extrazellulärer Matrix (ECM), Wachstumsfaktoren, Muskelzellen, Fettzellen, Endothelzellen und Zellen des Immunsystems bestehen kann (Hanahan and Weinberg 2011, Hanahan 2022). Die Zusammensetzung der Immunzellen und Signale aus dem TME haben einen Einfluss auf das Behandlungsergebnis (Dave, Wright et al. 2004, Dave 2008, Andor, Simonds et al. 2019, Tobin, Keane et al. 2019, Haebe, Shree et al. 2021, Mondello, Fama et al. 2021, Roeder, Baertsch et al. 2022). Wir verstehen zunehmend, dass die FL Zellen ihr eigenes TME verändern, um pro-survival Signale zu fördern und anti-FL Reaktionen des Immunsystems zu unterdrücken (immune evasion) (Kumar, Pickard et al. 2021). Hier spielen Genmutationen eine wichtige Rolle, doch die Biologie der meisten solcher Mutationen ist unklar.

1.5 Konvergente Evolution von Mutationen im FL

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit vielen Jahren mit der molekularen Ontogenie beim FL, also der zeitlichen Abfolge des Auftretens von Genmutationen. Der seltene Fall eines Spender-FL nach allogener Blutstammzelltransplantation hat wichtige Einblicke

ermöglicht (Weigert, Kopp et al. 2012, Stolz 2021). Konkret handelt es sich um eine Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie, die von ihrer Schwester eine Knochenmarkstransplantation sowie später drei Lymphozyten-Infusionen (DLI) erhielt. Sowohl die Spenderin als auch die Empfängerin entwickelten 9 Jahre später jeweils ein FL. Mittels Exom-Sequenzierung konnte festgestellt werden, dass in beiden FL die identische Translokation t(14;18) als auch viele identische somatischen Mutationen vorhanden waren, die auch schon Jahre zuvor in den DLIs nachweisbar waren (Weigert, Kopp et al. 2012). Unter den 15 gemeinsamen Mutationen war auch eine $CTSS^{M185V}$ -Mutation^a in *Cathepsin S* (*CTSS*) - ein Gen, dem im FL bisher keine Beachtung geschenkt wurde. Außerdem trugen beide FL zusätzliche, individuelle Mutationen, die mittels Targeted Hybrid Capture Resequencing genauer untersucht wurden. Neben der gemeinsamen $CTSS^{M185V}$ -Mutation waren bei den FLs noch unterschiedliche *CTSS* Missense-Mutationen nachweisbar, die für einen Aminosäuretausch an derselben Stelle $CTSS^{Y132}$ kodierten (Spender: $CTSS^{Y132N}$, Empfänger: $CTSS^{Y132S}$). Beide Mutationen hatten eine niedrige Allelfrequenz ($CTSS^{Y132N}$: 0,18; $CTSS^{Y132S}$: 0,08), waren nicht in der DLI vorhanden und wurden somit unabhängig voneinander in späteren Zweigen der klonalen Evolution bei der FLs erworben (Stolz 2021). Das weist auf einen Selektionsvorteil für *CTSS*-Mutationen an der Stelle $CTSS^{Y132}$ hin. Diese konvergente Evolution deutete stark auf funktionelle Relevanz hin. Im Folgenden wird daher genauer auf *CTSS* eingegangen.

1.6 Cathepsin S (*CTSS*)

1.6.1 Aktivierung und katalytische Eigenschaften von *CTSS*

CTSS ist eine lysosomale Cysteinprotease und wird wie die anderen 14 Cathepsine als Zymogen synthetisiert. Das 16 Aminosäuren (AS) lange Präpeptid (auch als Signalpeptid bezeichnet) wird während seiner Passage in das endoplasmatische Retikulum (ER) entfernt, wodurch das katalytisch noch inaktive Proenzym (pro-*CTSS*) entsteht. Das Amino-terminale (N-terminale) Propeptid (**Abbildung 2**) wirkt als potenter reversibler Inhibitor des reifen Enzyms, sorgt für die ordnungsgemäße Faltung, den Transport ins Endolysosom und verhindert bei vielen Cathepsinen, einschließlich *CTSS*, eine vorzeitige Aktivierung (Fox, de Miguel et al. 1992, Tao, Stearns et al. 1994, Carmona, Dufour et al. 1996, Coulombe, Grochulski et al. 1996, Maubach, Schilling et al. 1997, Fehn Dr. med. 2001, Schlabrakowski Dr. med. 2003). In der sauren Umgebung der späten

^a Aminosäuren werden von hier an immer hochgestellt geschrieben (z.B. $CTSS^{M185}$). Aminosäurewechsel werden von hier an durch einen zweiten hochgestellten Buchstaben annotiert (z.B. $CTSS^{M185V}$).

Endosomen/Lysosomen wird das N-terminale Propeptid abgespalten, wodurch ein aktives, reifes Enzym entsteht (Turk, Stoka et al. 2012). Die limitierte Proteolyse – die Umwandlung des inaktiven Proenzym zum aktiven Enzym – geschieht dabei autokatalytisch oder mit Hilfe anderer Proteasen und ist bei niedrigen pH-Werten am effizientesten (Turk, Turk et al. 2000, Vasiljeva, Dolinar et al. 2005).

Das katalytisch aktive Zentrum von CTSS wird von einer katalytischen Triade CHN gebildet, die aus einem Nukleophil (CTSS^{C139}), einer Base (CTSS^{H278}) und einer Säure (CTSS^{N298}) besteht und erst durch die Enzymfaltung in räumliche Nähe gebracht wird. Solche katalytischen Zentren sind auch bei verschiedenen anderen Cysteinproteasen zu finden und haben eine ähnliche Biochemie: sobald sich ein Komplex aus katalytischer Triade und Substrat gebildet hat, kann das Nukleophil C139 aktiviert werden und Peptidbindungen des Substrats hydrolysieren (Buller and Townsend 2013). Neben den Cysteinproteasen, die die größte Familie der Cathepsine darstellen, gibt es unter den Cathepsinen zwei Aspartatproteasen (Cathepsin D und E) und zwei Serinproteasen (Cathepsin A und G). Diese fungieren auf ähnliche Weise, wobei sich das Nukleophil des aktiven Zentrums unterscheidet (Aspartat bei den Aspartatproteasen und Serin bei den Serinproteasen).

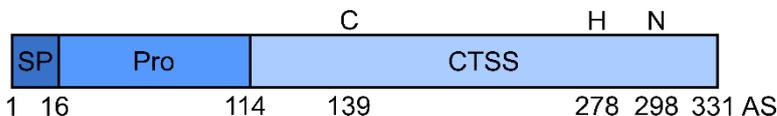


Abbildung 2 Primärstruktur von pro-CTSS mit katalytischer Triade bestehend aus dem nukleophilen (C), der Base (H), und der Säure (N); SP = Signalpeptid, Pro = Prodomäne, AS = Aminosäure.

1.6.2 Unterteilung der Cystein-Cathepsine

Die Cystein-Cathepsine können weiter nach ihrer proteolytischen Aktivität unterteilt werden: Cathepsin F, K, L, und S sind Endo-Peptidasen und schneiden im Inneren einer Peptidkette, Cathepsin B,C, H, und X sind Exo-Peptidasen und spalten nur endständige Peptidbindungen einer Aminosäuresequenz (Turk, Stoka et al. 2012).

1.6.3 Gewebespezifische Expression von CTSS

Die meisten Cathepsine (B,C, F, H, L, O, V und X) werden ubiquitär in den meisten Geweben exprimiert und dienen der intrazellulären Proteinprozessierung. Ausnahmen sind Cathepsin K, W und S, die eine gewebespezifische Expression und Funktion haben. Cathepsin K wird hauptsächlich in Osteoklasten exprimiert, Cathepsin W in CD8⁺ T Zellen und NK Zellen. Cathepsin S wird dagegen in Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) – Dendritische Zellen und B Zellen – stark exprimiert und bleibt bei neutralem pH-Wert

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

aktiv, was auf eine mögliche Rolle bei extra-lysosomalen und extrazellulären Aktivitäten hindeutet (Turk, Stoka et al. 2012).

1.7 CTSS ist an verschiedenen intra- und interzellulären Prozessen beteiligt

Cathepsine sind promiskuitive Proteasen und ihr Einfluss auf die Substratspaltung hängt stark von der Expressionsmenge in unterschiedlichen Zelltypen sowie deren Lokalisation ab. So sind Cathepsine in fast alle Prozesse integriert, die mit dem Lysosom in Verbindung stehen: z.B. Proteinabbau, Protein- und Lipidstoffwechsel, Autophagie, Antigenprozessierung, Recycling von Wachstumsfaktorrezeptoren, zelluläre Stresssignalwege und Lysosom vermittelter Zelltod. Es gibt verschiedene intra- und interzelluläre Wege, an denen CTSS beteiligt ist, darunter Antigenprozessierung, CD74-Spaltung, Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalisierung, Invasion und Migration, und verschiedene Zelltodwege (Honey and Rudensky 2003, Matsumoto, Saitoh et al. 2008, Kenneth M. Murphy 2009) (**Abbildung 4**).

1.7.1 Die Rolle von CTSS bei der Antigenprozessierung und Präsentation

CTSS ist unter den Cystein-Cathepsinen einzigartig, da es nur in APCs und anderen Immunzellen wie Makrophagen hoch exprimiert wird (Morton, Zacheis et al. 1995). Es hat sich gezeigt, dass CTSS eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunantwort spielt. In APCs prozessiert CTSS Antigene für deren Präsentation auf dem MHC-Klasse-II-Komplex (MHC-II) und baut die MHC-II-associated invariant chain (CD74) ab, um MHC-II-associated invariant chain peptide (CLIP) freizusetzen, das die MHC-II-Peptidbindungsfurche vor vorzeitiger Peptidbindung schützt (Honey and Rudensky 2003). Mäuse bei denen CTSS ausgeknockt wurde zeigen einen verringerten Abbau von CD74, was zur Bindung und Präsentation einer Vielzahl von CD74 Fragmenten auf MHC-II führte (Nakagawa, Brissette et al. 1999). Außerdem war die Entwicklung der Keimzentren reduziert, was auf eine gestörte Aktivierung und Proliferation von B Zellen in diesen Mäusen schließen lässt (Shi, Villadangos et al. 1999). Dies deutet darauf hin, dass CTSS eine wichtige Rolle in verschiedenen immunologischen Signalwegen spielen kann.

1.7.2 Die Rolle von CTSS im Toll-like-receptor (TLR) Signalweg

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkennen konservierte mikrobiellen Moleküle auf der Zelloberfläche (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) (Poltorak, Smirnova et al. 1998, Takeuchi, Kawai et al. 1999, Ozinsky, Underhill et al. 2000, Hayashi, Smith et al. 2001) oder von

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Krankheitserregern stammende Nukleinsäuren innerhalb der Endosomen (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9) (Hemmi, Takeuchi et al. 2000, Alexopoulou, Holt et al. 2001, Heil, Hemmi et al. 2004) und können somit die angeborene Immunantwort initiieren (Janeway and Medzhitov 2002). CTSS ist zusammen mit anderen Cathepsinen (CTSB, CTSL und CTSF) (Matsumoto, Saitoh et al. 2008) und möglicherweise weiteren Proteasen (Ewald, Lee et al. 2008), durch proteolytische Spaltung der TLR9 Ektodomäne, am TLR9-Signalweg beteiligt (Park, Brinkmann et al. 2008). Allerdings sind die Details über die Beteiligung der Cathepsine unklar und die Publikationen dazu teils widersprüchlich. Wenn Zellen mit TLR9-Liganden stimuliert werden, bindet ein durch Cathepsine prozessiertes Carboxy-terminales (C-terminales) TLR9 Fragment MYD88, um die Signalübertragung zur NF- κ B Aktivierung auszulösen. Andererseits wurde gezeigt, dass CTSS für die Prozessierung von full length TLR9 zu einem inhibitorischen TLR9 (sTLR9) verantwortlich ist (Chockalingam, Cameron et al. 2011). Es besteht sogar die Möglichkeit, dass TLR9 je nach gebundener DNA-Struktur unterschiedlich prozessiert wird, was die Beteiligung verschiedener Proteasen erklären würde (Chockalingam, Cameron et al. 2011).

1.7.3 Die extrazelluläre Rolle von CTSS

Die ECM besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und Makromolekülen (z.B. Kollagene, Laminine und Fibronectin), die sowohl für die strukturelle Unterstützung als auch für die organisatorische Architektur innerhalb des Gewebes sorgen. In normalen Lymphknoten besteht die ECM aus Basalmembranproteinen wie Laminin, Kollagen Typ III+IV (Karttunen, Apaja-Sarkkinen et al. 1988). Die ECM wird in allen Geweben kontinuierlich und kontrolliert umgestaltet, um bspw. die Formbildung des Darms und der Lunge, sowie Angiogenese und Neovaskularisierung zu regulieren. Fehler in der Zusammensetzung, Struktur, Steifigkeit und Menge der ECM können zu Krankheiten führen und bspw. Krebszellen erlauben, sich einfacher auszubreiten. Lysosomale Exozytose kann zum Ausstoß von Cathepsinen in das TME führen und dort neben Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, Zellrezeptoren, Zell-Zell Kontakt Moleküle, auch die ECM abbauen (Haka, Grosheva et al. 2009, Vidak, Javorsek et al. 2019). Extrazelluläres CTSS ist bei der Fibronectin-, Laminin-, Collagen Typ 2-, Aggrekan-, Plexin-, und Fraktalkin-Spaltung beteiligt, was mit Krankheitsbildern wie Krebs, Fettgewebsbildung, Darmtrauma, Lungenfibrose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Osteoarthritis, und neuropathischen Schmerzen assoziiert ist. Dies stellt die Rationale dar, CTSS-Inhibitoren zu entwickeln (Buck, Karustis et al. 1992, Ishidoh and Kominami 1995, MORT, MAGNY et al. 1998, Goto, Yamaza et al. 2003, Wang, Sun et al. 2006, Son, Kim et al. 2009, Wiener,

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Sun et al. 2010, Bonnans, Chou et al. 2014, Fonović and Turk 2014, Sobotič, Vizovišek et al. 2015).

1.7.4 Apoptose

Cathepsine sind eng an der Regulation von Zelltod beteiligt (Olson and Joyce 2015). Die Permeabilisierung der lysosomalen Membran (LMP), die z. B. durch das therapeutische Detergens LLOMe ausgelöst wird, kann zur Freisetzung kleiner Cathepsine in das Zytoplasma führen. Bemerkenswert ist, dass nur wenige Cathepsine außerhalb des Lysosoms aktiv bleiben, darunter CTSL (für Minuten (min)) und CTSS (für Stunden (Stdh)) (Turk, Stoka et al. 2012). Die Freisetzung von Cathepsinen in das Zytoplasma kann dann zu einer Spaltung von Mitgliedern der BCL2-Familie führen (Turk, Stoka et al. 2002, Stoka, Turk et al. 2005), einschließlich der proteolytischen Inaktivierung des anti-apoptischen MCL1 und der Spaltung von BID zu proapoptotischem truncated BID (tBID) (Drogamuzova, Bojic et al. 2008), was zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (MOMP) führt, und schließlich, über Aktivierung von Caspasen, zur Apoptose. Während Cathepsine wie CTSB und CTSL bei neutralem pH-Wert im Zytoplasma irreversibel gehemmt werden können, bleibt CTSS aktiv und könnte daher eine entscheidende Rolle bei der Apoptose spielen (Turk, Bieth et al. 1995, Turk, Stoka et al. 2012).

1.8 Regulation der CTSS-Aktivität

Cathepsine sind an zahlreichen Prozessen beteiligt, sowohl intra- und extra-lysosomal als auch intra- und extra-zellulär, und ihre Eigenschaften sind stark kontextabhängig (Olson and Joyce 2015). Zellen benötigen daher Mechanismen, um die Cathepsinaktivität zu regulieren. Wie viele andere Proteasen wird auch CTSS auf Transkriptions-, Translations- und Posttranslationsebene reguliert.

1.8.1 Regulation auf Transkriptionsebene

In *CTSB*, *CSTC*, *CTSL*, *CTSS* und *CTSX* Promotoren wurden Zinkfinger-Transkriptionsfaktor 1 (SP1)- und Zinkfinger-Transkriptionsfaktor 3 (SP3)-Bindungsstellen gefunden, doch ein funktioneller Link von SP-Bindung und erhöhter *CTSS*-Expression ist bisher unklar (Mohamed and Sloane 2006). Weiterhin konnte in Alveolarepithelzellen (A549) ein Interferon-stimuliertes Response-Element (ISRE) im *CTSS*-Promotor identifiziert werden. IRF-1 konnte in diesen Zellen die Aktivität des *CTSS*-Promoters erhöhen. Allerdings wurde ein direkter Effekt auf die *CTSS*-Expression nur in 293T Zellen gezeigt (Storm van's Gravesande, Layne et al. 2002). Auch in Makrophagen veränderte sich die

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

CTSS-mRNA-Expression nach Interferon- γ (IFN- γ) Behandlung nicht (Beers, Honey et al. 2003). Auf der anderen Seite konnte festgestellt werden, dass das in Lymphomen häufig deletierte *BLIMP1/PRDM1* ein transkriptioneller Repressor von *CTSS* ist (Pasqualucci, Compagno et al. 2006, Kim, Schatzle et al. 2017), was in der Überexpression von *CTSS* resultieren könnte. Die genaue transkriptionelle Regulation von *CTSS* in den unterschiedlichen Zelltypen, die bei FL eine Rolle spielen, muss aber noch geklärt werden.

1.8.2 Regulation auf Proteinebene

Die Regulation der Cathepsine auf der Proteinebene ist Bestandteil eines größeren, integrierten Netzwerks (Olson and Joyce 2015), was die Messung der enzymatischen Nettoaktivität und deren klinische Relevanz zu einer Herausforderung macht (Cox 2009). Die Regulation wird durch i) Inhibierung des katalytisch aktiven Cathepsins durch die eigene Propeptidomäne (Dickinson 2002) und teilweise durch die Propeptidomäne verwandter Cathepsine (Carmona, Dufour et al. 1996), ii) die Kompartimentierung in das Lysosom mit saurem pH-Wert, und iii) durch Antiproteasen, wie endogene Cathepsin Inhibitoren der Cystatin Familie, gewährleistet (Cox 2009, Turk, Stoka et al. 2012, Wilkinson, Williams et al. 2015).

Die endogenen Cathepsin Inhibitoren der Cystatin Familie sind reversible kompetitive Inhibitoren und bilden ein Regulationssystem für Cysteinproteasen, die aus dem Lysosom austreten und kontrollieren die zytosolische Cathepsin Netto-Aktivität, und damit auch Prozesse wie die Lysosom-vermittelte Apoptose (Shah and Bano 2009, Ochieng and Chaudhuri 2010).

Die Cystatine wurden auf der Grundlage ihrer Lokalisation, Größe und Zusammensetzung in drei Familien eingeteilt (G 1986, Shah and Bano 2009, Wallin, Bjarnadottir et al. 2010):

Familie 1) Stefine (Stefin A und Stefin B, alias Cystatin A und Cystatin B; CSTA und CSTB) sind unglykosylierte, weitestgehend intrazelluläre Inhibitoren (Turk and Bode 1991), die aber auch im Serum detektierbar sein können (Abrahamson, Barrett et al. 1986). Sie haben eine molekulare Masse (MW) von ~11 kD, keine Signalsequenz und keine Disulfidbrücken. Es ist bekannt, dass CSTB über die AS-Sequenz QVVAG eine nicht-kovalente Interaktion mit dem aktiven Zystein 25 von Cysteinproteasen bildet (**Abbildung 3**) (Stubbs, Laber et al. 1990).

Familie 2) Cystatin C, D, S, SA und SN sind teils glykosylierte, extrazelluläre Inhibitoren mit einem MW von 13-14 kD. Sie haben eine Signalsequenz für deren Sekretion und Disulfidbrücken am C-terminus des Moleküls.

Familie 3) Kininogene sind multifunktionale, glykosylierte, intravaskuläre Inhibitoren. Sie haben ein MW von 88-114 kD und drei Cystatin-Domänen der Familie 2.

Es wird vermutet, dass die Cystatine als Abwehrreaktion gegen die Überexpression von Proteasen und somit gesteigerter proteolytischer Aktivität hochreguliert werden können (Turk, Turk et al. 2002, Werle, Schanzenbächer et al. 2006). Die Cystatine können die Cathepsinaktivität in unterschiedlichen Kompartimenten regulieren und bilden somit auch einen wichtigen Bestandteil der CTSS-Regulation (**Abbildung 4**).

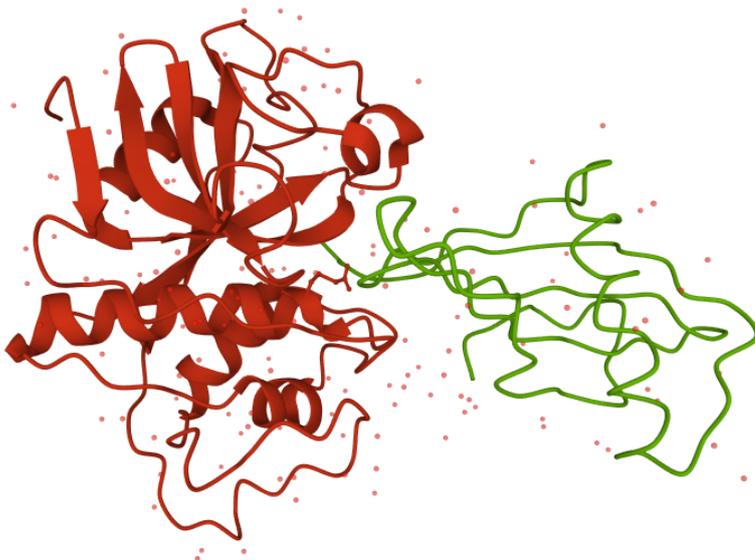


Abbildung 3 Die 2,4 Angström Röntgenkristallstruktur von rekombinantem humanen Stefin B (in Grün) im Komplex mit der Cysteinprotease Papain (in Rot). PDB Nummer = 1STF.

1.8.3 Bedeutung von CSTB bei der CTSS Inhibierung

Die Rolle der Cystatine bei FL wurde bisher nicht untersucht. Es gibt allerdings Studien in anderen B Zell Lymphomen, die die Level an Cystatin C im Serum von Patienten als Marker für die glomeruläre Filtrationsrate bei verschiedenen Nierenerkrankungen überprüft haben (Kos, Krasovec et al. 2000, Mulaomerović, Halilbasić et al. 2007). Auch in DLBCL wurden die Cystatine bisher nur im Serum gemessen und erhöhte Cystatin Level sind mit einer größeren Tumormass assoziiert (Hammouda, Salah El-Din et al. 2017).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

CTSS kann *in vitro* durch eine Reihe von Cystatinen gehemmt werden: CSTA, CSTB, CSTC, CSTD, und Kininogene H und L (Turk, Stoka et al. 1995, Turk, Stoka et al. 1996, Turk, Stoka et al. 2008). Unter diesen Cystatinen ist vor allem CSTB mit der Veränderung der CTSS Aktivität assoziiert worden (Turk and Bode 1991, Kos, Krasovec et al. 2000, Rinne, Saukko et al. 2002, Turk, Stoka et al. 2008). Weiterhin wurden Funktionsverlust-Mutationen in *CTSB* und folglich eine höhere Cathepsinaktivität bei Patienten mit der neurodegenerativen Erkrankung Unverricht-Lundborg-disease (EPM1) nachgewiesen (Rinne, Saukko et al. 2002, Polajnar, Zavašnik-Bergant et al. 2014). Die Bedeutung der Zunahme der Cathepsinaktivität für die EPM1-Pathogenese ist allerdings bisher unklar, es wird aber eine Rolle des oxidativen Stresses vermutet (Trstenjak Prebanda, Matjan-Stefin et al. 2021).

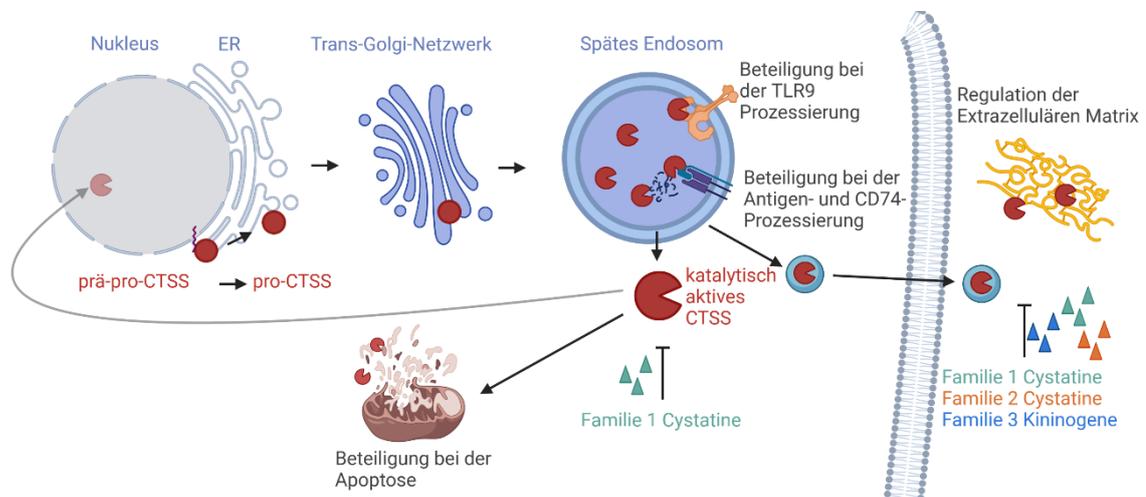


Abbildung 4 Zusammenfassung der Aktivierung, der Beteiligung an intra- und interzellulären Prozessen, und der Regulation von CTSS.

CTSS wird wie andere Cathepsine als inaktives Zymogen synthetisiert und ist erst nach der Entfernung der Pro-Domäne in den Endosomen katalytisch aktiv. Von dort aus kann CTSS extrazellulären Raum sezerniert werden. Pfeile deuten die mögliche Lokalisierung von katalytisch aktivem CTSS an. Die Lokalisierung von Familie 1-3 Cystatinen ist durch kleine Dreiecke gekennzeichnet. ER = Endoplasmatisches Retikulum.

1.9 Vorarbeiten: CTSS-Mutationen in FL

Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe wurden single-cell Klone von B-NHL Zelllinien mit und ohne FL-typischer t(14;18) Translokation (Karpas422 und DB, sowie DG-75) generiert, bei denen mittels CRISPR-Cas9 entweder ein CTSS Knock-out (CTSS^{KO}) oder ein Knock-in (KI) der CTSS-Mutationen CTSS^{Y132D} und CTSS^{M185V} eingeführt wurde (Stolz 2021). Es konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass die Zelllinien mit CTSS^{Y132D} KI eine höhere Ratio von aktivem CTSS (24 kD) zu pro-CTSS (36 kD) hatten, im Vergleich zu CTSS-Wildtyp (CTSS^{WT}). Dies ging auch mit einer erhöhten proteolytischen Aktivität einher. Es wurde somit zum ersten Mal **Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom**

gezeigt, dass die CTSS^{Y132D}-Mutation zu einer Funktionssteigerung von CTSS führt (gain-of-function-Mutation). Darauf aufbauend habe ich in meiner Masterarbeit die molekularen Mechanismen von CTSS-Mutationen im FL untersucht (Hildebrand 2018). Durch Aufreinigung von FLAG-markiertem pro-CTSS konnte ich zeigen, dass die CTSS^{Y132D} die Umwandlungskinetik von pro-CTSS zu aktivem CTSS beschleunigt. Strukturmodelle suggerierten außerdem, dass CTSS^{Y132} mit CTSS^{H79} der Prodomäne von CTSS interagieren könnte. Daher habe ich eine CTSS^{H79A}-Mutation erzeugt und die proteolytische Aktivität gemessen. Allerdings konnten keine Unterschiede im Vergleich zum WT festgestellt werden (Hildebrand 2018). Wie genau also CTSS^{Y132D} die Umwandlung von pro- zu aktivem CTSS beeinflusst hieß es weiter zu ermitteln.

2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit ist es die funktionelle und klinische Bedeutung von CTSS-Hyperaktivität im FL zu definieren. Dies wurde in folgenden Arbeitsschritten angegangen:

1. Untersuchung der Biochemie der CTSS-Hyperaktivität.
2. Untersuchung des zellulären Phänotyps der CTSS-Hyperaktivität.
3. Auswirkung der CTSS-Hyperaktivität in einem FL Mausmodell.
4. Korrelation der CTSS-Aktivität mit dem Therapieergebnis.
5. Definition funktionell relevanter regulatorischer Netzwerke, die die enzymatische Nettoaktivität von CTSS bestimmen.
6. Untersuchung therapeutischer Schwachstellen von Krebszellen mit CTSS-Hyperaktivität.

Die Ergebnisse der Arbeitsschritte 1-4 wurden in meiner geteilten Erst-Autorenschaft (Bararia, Hildebrand et al. 2020) veröffentlicht.

3. Material and Methoden²

3.1 Material

3.1.1 Plasmide

PLASMID	QUELLE
control shRNA Plasmid-A (sh_Ctrl)	Santa Cruz sc-108060
CTSS (Homo sapiens) im pDONR201 (Gateway donor/master vector)	Dnasu plasmid repository Clone ID HsCD00005390
pcDNA™6/TR vector Mammalian Expression Vector	ThermoFisher Scientific Cat# V102520
pCL-Eco (EcoPack)	Addgene #12371
pEBO puro-SP-FLAG-ProCTSS-Tet-NGFR-GFP	Klonierung
pEBO puro-SP-FLAG-ProCTSS-Y132D-Tet-NGFR-GFP	Klonierung
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen	Harvard plasmid repository Clone EvNO00061605
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen	Harvard plasmid repository Clone ID EvNO00061605
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen (pCIG GW)	Harvard plasmid repository Clone ID: EvNO00061605
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen CTSS M185V	Klonierung
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen CTSS WT	Klonierung
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen CTSS Y132D	Klonierung
pHAGE CMV MCS-IRES-ZsGreen CTSS Y132S	Klonierung
pMSCV-IRES-GFP	Addgene #52107
pMSCV-IRES-GFP	Addgene 52107
pMSCV-IRES-GFP (pMIG GW)	Addgene plasmid #20672 mit Gateway Cassette
pMSCV-IRES-GFP CTSS WT	Klonierung
pMSCV-IRES-GFP CTSS Y132D	Klonierung
psPAX2	Addgene #12260
pSpCas9(BB)-2A-GFP	Addgene_48138
shCSTB Plasmid	Santa Cruz sc-44431-SH
VSVG	Addgene #14888

3.1.2 Biologische Proben

PATIENTENPROBEN	QUELLE
Primäre Patientenproben (discovery cohort)	(Tobin, Keane et al. 2019, Bararia, Hildebrand et al. 2020)
Primäre Patientenproben (GLSG2000, BCCA Kohorte)	(Weigert, Kopp et al. 2012, Pastore, Jurinovic et al. 2015, Bararia, Hildebrand et al. 2020)

3.1.3 Materialien/Chemikalien

REAGENZ	QUELLE
1 kb Plus DNA Ladder	New England Bio Labs, Massachusetts/USA
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
100 bp ladder	New England Bio Labs, Massachusetts/USA
10x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)	Life technologies, California/USA
10x TRIS-Borat-EDTA (TBE)	Life technologies, California/USA
2-Mercaptoethanol (50 mM)	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA,
40% Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
6x Gel loading dye purple (6x), no SDS	New England Bio Labs, Massachusetts/USA
Agarose	Bioline, Toronto/Canada

² Ein Teil der Methoden wurde 2020 in Bararia und Hildebrand et al. in Cell Reports publiziert

Amersham enhanced chemiluminescence (ECL) prime western blotting detection reagent	GE Healthcare, Chicago/USA
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Bromphenolblau	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cathepsininhibitor: Z-FF-FMK from Cat#K144	BioVision, California/USA
Cathepsinsubstrat: Z-FR-AMC	Bachem, Switzerland
CTSB Substrat: Z-R-R-AMC Cat#SCP0108	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
CTSH Substrat: R-AMC Cat#257370	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
CTSS Substrat: Z-VVR-AFC from Cat#K144	BioVision, California/USA
Deoxycholsäure Natriumsalz	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Dextransulfat Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dynabeads Maus CD8 (Lyt-2)	Invitrogen, California/USA
E-64	Sigma E3132
Essigsäure	Honeywell, Morristown/USA
Ethanol (EtOH)	VWR, Radnor/USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	VWR, Radnor/USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FBS)	Pan-Biotech, Aidenbach
FLAG-M2 affinity gel	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
FLAG-M2 magnetic beads	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
GlutaMAX™ supplement	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA,
Glyzin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren (100x)	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA,
Milchpulver	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazide 10%	Morphisto, Frankfurt am Main
Natriumchlorid	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Natriumthiosulfat	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Nonyl phenoxy polyethoxyethanol (NP-40)	Appllichem, Barcelona/Spain
Nuclease freies H ₂ O	Invitrogen, California/USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 bis 250 kD	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
PenStrep (Penicillin 10.000 U/mL, Streptomycin 10.000 µg/mL)	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
Phosphatase inhibitor cocktail 2	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Phosphatase inhibitor cocktail 3	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
Pierce enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting substrate	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
Polysorbat 20 (TWEEN)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for western blotting	GE Healthcare, Chicago/USA
Proteaseinhibitor	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Protein G agarose beads	Sigma-aldrich, St. Louis/USA
Protein-G agarose	Roche, Basel/Switzerland
ROTI®GelStain, 1 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Silberniträt	Merck, Darmstadt
Super Optimal Broth (SOC)-Medium	Invitrogen, California/USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Promega, Madison/USA
TRIZOL	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Trypsin Gold Mass spectrometry grade	Promega, Madison/USA
Universalagarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

3.1.4 Zellkulturmedien

MEDIUM	QUELLE
AIM-V-Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Gibco™ IMDM	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Gibco™ Opti-MEM™ I serumreduziertes Medium, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
RPMI 1640 with L-Glutamine	Capricorn scientific, Ebsdorfergrund
DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine	Capricorn scientific, Ebsdorfergrund

3.1.5 Kunststoffartikel

MATERIAL	QUELLE
0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL Protein-, DNA- low binding Eppendorf Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
13 mL Multiply-µStrip Pro	Sarstedt, Nümbrecht
15 mL, 50 mL Falcons	Sarstedt, Nümbrecht
2 mL, 5 mL, 10 mL STRIPETTE	Corning, New York/USA
25 mL STRIPETTE	Greiner bio-one, Kremsmünster/Austria
5 mL, 14 mL Polystyrene Round-bottom tube	Falcon, Mexico city/Mexico
7 mL, 15 mL Biosphere sc MicroTube	Sarstedt, Nümbrecht
96-well Platte	Greiner bio-one, Kremsmünster/Austria
Elektroporationsküvette	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
MaXtract High Density tubes	Qiagen, Venlo/Netherlands
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettes Research Plus 2.5 µL, 10µL, 100µL, 1000µL	Eppendorf, Hamburg
Safe-lock tubes 0.5 mL, 1.5 mL amber	Eppendorf, Hamburg
Vasco Nitril blue powder free Handschuhe	BRAUN, Kronberg im Taunus

3.1.6 Kommerzielle Assays

ASSAY	QUELLE
Cathepsin S Activity Fluorometric Assay Kit	BioVision, Waltham/USA Cat#K144
CTSS TaqMan® Genexpressions Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA Scientific Cat# Hs00175407_m1 CTSS und Hs99999907_m1 B2M
Direct-zol™ RNA-isolierungskit	Zymo Research, Irvine/USA Cat#R2055
ExpressArt FFPE Clear RNAREady kit	AmpTec, Hamburg Cat# 9009-A100
Gateway™ Vector Conversion System	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA Cat#11828029
MycoAlert PLUS Mykoplasmen-Nachweiskit	Lonza, Basel/Switzerland Cat#LT07-703
nCounter Elements XT Reagents Gene Kit	NanoString, Washington/USA Cat#XT-ELE-P1TS-012
nCounter PanCancer Immune Profiling Panel	NanoString, Washington/USA Cat#XT-CSO-HIP1-12
Oncoscan® CNVkit	Affymetrix, Santa Clara/USA Cat#902293
Pierce BCA-Assay	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA Cat#23227
SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Waltham/USA Cat#18080-051

3.1.7 Geräte

GERÄT	HERSTELLER
Bolt Mini Gel Tank	Invitrogen, Waltham/USA
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
CO2-incubator	Binder, Tuttlingen
DMI8 widefield fluorescence microscope	Leica, Wetzlar
Dunstabzugshaube	TROX Technik, Neukirchen-Vluyn
EasySep magnet	Stemcell technologies, Vancouver/Canada

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Eismaschine	Hoshizaki, Suzhou/China
Electroporator	Easyject, Luton/UK
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fusion SL Vilber Lourmat	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
GloMax® Discover Multimode Microplate Reader	Promega, Madison/USA
HERA safe sterile workbench	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
HS260 basic Schüttler	IKA, Staufen im Breisgau
IKAMAG REO Magnetrührer	IKA, Staufen im Breisgau
Light microscopy Tubus, Modell FSA	Leitz, Wetzlar
Mikrowelle	Siemens, München
Mini-Inkubator	Labnet, Edison/USA
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Multipette M4	Eppendorf, Hamburg
Multitron incubator	Infors HT, Bottmingen/Switzerland
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phoenix instrument RS-TR05 tube roller	Phoenix instrument, Accident/USA
Pierce Power Blotter / Stainer	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Quantum-ST4 1100-26MX UV-Scanner	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Qubit 3.0 Fluorometer	Invitrogen, California/USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
Umlaufschüttler DRS-12	NeoLab, Heidelberg
Vi-CELL® Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Brea/USA
Vilber Fluoromat	Vilber, Collégien/France
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia/USA
Wasserbad Typ 1003, 14 l	GFL, Hannover
XCell Sure Lock™	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
X-TRACTA Generation II	Biozym, Hessisch Oldendorf

3.1.8 Puffer

PUFFER	INHALT
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS
1 x Trisgepufferte Salzlösung mit Tween (TBS-T)	10 mM Tris, 166 mM Natriumchlorid, 0.1% Tween-20
1-Step Transferpuffer	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
4 x Laemmli-puffer	40% Glycerol, 8% SDS, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.04% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol
4x Lithiumdodecylsulfat (LDS) Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham/USA
5x Passiver Lysepuffer (PLB)	Promega, Madison/USA
Aktivitätspuffer	BioVision Kit Puffer – Zusammensetzung unbekannt
Ampicillin-Agar	35 g Pulver in 1 L H ₂ O, 100 µg/mL Ampicillin
Blocking Lösung	5 g Milchpulver in 1 L TBS-T
Entfärbelösung	10% Ethanol, 7.5% Essigsäure in H ₂ O
Fixierungslösung	40% Ethanol, 10% Essigsäure, 50% H ₂ O
Gelfixierungspuffer	10% Methanol, 10% Essigsäure
HEPES Puffer 1M	Pan-Biotech, Aidenbach Cat#P05-01100
Lysogeny Broth Medium (LB-Medium)	20 g Pulver in 1 L H ₂ O, LB-Amp Medium: 50 µg/mL Ampicillin
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec Cat#130-091-376
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck, Darmstadt Cat# E504-500ML
Polyethylenimin (PEI)	1 g PEI in 1 L H ₂ O pH 7.0
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	ThermoFisher Scientific Cat#21059
RIPA Puffer	150 mM Natriumchlorid, 1% NP-40, 0.5% Natriumdesoxycholat, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

3.1.9 Gele

GELTYP	INHALT
12% Tris-Glycine SDS Gel (10 Wells)	12% Acrylamid, 0.38 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% Ammoniumpersulfat, 0.04% TEMED, auf 7.5 mL mit H ₂ O aufgefüllt
Agarosegel 0.8% - 1.2% (10 Wells)	0.4 g – 0.6 g Agarose in 50 mL H ₂ O
4-12% Gradientengel/12% Bis-Tris Gel (10 Wells)	Vorgelassen von ThermoFisher Scientific, Artikelnummern: NP0326BOX und NP0341PK2

3.1.10 Antikörper

PRIMÄRANTIKÖRPER	SPEZIES	QUELLE	KLON	VERDÜNNUNG	MOLEKULARGEWICHT DES ZIELPROTEINS
A. aeolicus BPL/BiolD2 Antibody	Maus	Novus Biologicals Cat# NBP2-59941	SS 3A5-E2	1:500	Abhängig vom Fusionsprotein
BCL6	Hase	Cell Signaling Cat# 14895S	D4I2V	1:1000	87-98 kD
BID	Hase	Cell Signaling Cat# 2002S	N/A	1:2000	15 / 22 kD
CD74	Maus	Abcam Cat# ab-181465	2D1B3	1:2000	34 kD, 9 kD
CTSB	Maus	R&D MAB1408	225228	1:1000	12 kD
Histone H3	Hase	Cell Signaling Cat# 9715S	pAb	1:1000	17 kD
IgG der Maus	Maus	Santa Cruz Cat# sc-2025	N/A	2 µg/IP	25kD, 50 kD
IgG der Ziege	Ziege	Santa Cruz Cat# sc-2028	N/A	2 µg/IP	25kD, 50 kD
Lamin B1	Hase	Cell Signaling Cat# 13435S	D9V6H	1:1000	67 kD
MCL1	Hase	Cell Signaling Cat# 4572S	pAb	1:1000	40 kD
PARP	Hase	Cell Signaling Cat# 9542S	pAb	1:1000	89 / 116 kD
α-BCL2	Maus	Santa Cruz #Sc-509	N/A	1:1000	26 kD
α-CSTB	Maus	R&D Cat# MAB1408	225228	1:1000	12 kD
α-CTSS N-terminal	Ziege	R&D Cat#AF1183	N/A	1:2000	37 kD, 31 kD, 24 kD
α-FLAG-M2	Maus	Sigma Cat# F3165	N/A	1:3000	1 kD
α-GAPDH	Maus	Thermo Fisher Cat# AM4300	6C5	1:20000	36 kD

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

α -GFP	Hase	Invitrogen Cat# A11122	N/A	1:5000	27 kD
α -Na K ATPase	Hase	Abcam Cat# ab76020	EP1845Y	1:5000	113 kD
α - β -tubulin	Hase	Cell Sig- naling Cat# 2128S	9F3	1:6000	55 kD

PRIMÄRANTI- KÖRPER FÜR DURCHFLUSSZY- TOMETRIE	SPE- ZIES	QUELLE	KLON	VERDÜNNUNG	CAT#
α -CD3 PE	Maus	Biologend	UCHT1	1: 100	300407
α -CD8 BV763	Ziege	Thermo Fisher	#53-6.7	1:100	14-0081-82
α -CD19 PE-Vio770 (PE- Cy7)	Maus	Biologend	REA749	1:100	302242
TCR- β AF700	Ham- ster	Thermo Fisher	#H57-597	1:1500	56-5961-82
CD19 eFlour660	Ratte	Thermo Fisher	#eBio1D3	1:200	50-0193-82
α -CD4 PerCP-Cy 5.5	Ziege	Thermo Fisher	#RM4-5	1:50	45-0042-82

PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR IHC UND MULTISPEKTRALE BILDANALYSE	SPEZIES	QUELLE	KLON	VER- DÜN- NUNG	CAT#
CD20	Maus	Cell Marque	L26	1:200	120M-8
CD34	Maus	Beck- man- Coulter	QBEnd10	1:700	IM1185
CD4	Hase	Sigma- Aldrich	EP204	1:200	104R-26
CD4	Hase	Sigma- Aldrich	EP204	1:200	104R-2
CD4	Maus	Leica Bi- osystems	4B12	1:25	PA0371
CD8	Maus	Cell Marque	C8/144B	1:300	108M-94
CD8	Maus	Dako	C8/144B	1:200	M7103
CD8a	Hase	Cell Sig- naling	D8A8Y	1:200	85336
CTSS	Ziege	R&D	Polyclo- nal	1:50	AF1183
ki67	Hase	Cell Marque	SP6	1:200	275R-1
PD1	Maus	Medac	MRQ22	1:80	315M-95
PD1	Maus	Cell Marque	MRQ-22	1:200	315M-95
PDL1	Hase	DCS	QR1	1:150	PI516C002
PDL1	Hase	Cell Sig- naling	E1L3N	1:200	13684

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

PDL2	Hase	Cell Sig- naling	D7U8C	1:50	82723
------	------	---------------------	-------	------	-------

3.1.11 Enzyme

ENZYM	QUELLE	SCHNEIDESEQUENZ	REAKTIONSTEMPERATUR
BamHI	New England Biolabs Cat# R0136S	5'G↓GATCC3' 3'CCTAG↑G5'	37 °C
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	ThermoFisher Scientific Cat# 18009019	Keine	37 °C
DpnI	New England Biolabs Cat# R0176S	5'GAm6↓TC3' 3'CT↑Am6G5'	37 °C
EcoRI	New England Biolabs Cat# R0101S	5'G↓AATTC3' 3'CTTAA↑G5'	37 °C
SfiI	New England Biolabs Cat# R0123S	5'GGCCNNNN↓NGGCC3' 3'CCGGN↑NNNNCCGG5'	50 °C
T4 DNA Ligase	New England Biolabs Cat# M0202S	Keine	16 °C
XhoI	New England Biolabs Cat# R0146S	5'C↓TCGAG3' 3'GAGCT↑C5'	37°C

3.1.12 Daten aus Datenbanken

STOFF	QUELLE
CTSS Struktur	Protein Data Bank PDB code: 2C0Y
Genexpressionsdaten (GLSG2000 and BCCA)	Gene Expression Omnibus (GEO) repository GSE66166
Genexpressionsdaten (Validierungskohorte)	GEO GSE147033
Genexpressionsdaten maligner vs. nicht-maligner FL Zellen	GEO GSE62246
Single-cell RNA-Sequenzierungsdaten	(Haebe, Shree et al. 2021)

3.1.13 Zelllinien

ZELLINIE	QUELLE
Human: DG75	ATCC Cat# CRL-2625
Human: HBL1	Daniel Krappmann lab Helmholtz
Human: HEK293T	ATCC Cat# CRL-11268
Human: Karpas 422	Ximbio Cat# 152419
Human: OCI-Ly8	ATCC Cat# CVCL_8803
Human: Z138	ATCC Cat# HTB-14
Maus: A20	ATCC Cat# TIB-208

3.1.14 Mausmodelle

MAUSMODELL	QUELLE
Maus: BALB/c	Jackson Laboratory 000651

3.1.15 Primer

PRIMER	SEQUENZ
315_fwd	GGT GGA GGC CGG TCG GGT
315_rev	TAC GTA GAA TTC GGA TCC GCC AGT CTA GAG
CTSS_BamHI_fwd_3	GCG AGG ATC CAT GAA ACG GCT GGT TTG TG
CTSS_BamHI_rev_3	GCA CGG ATC CGA TTT CTG GGT AAG AGG GAA AGC

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

CTSS_cDNA_PCR_fwd	ATG AGG GCT CCTGGC CAC GC
CTSS_cDNA_PCR_rev	TTA GAT TTC TGG GTA AGA GCA ATA ACT AGC AAT TCC G
CTSS_cDNA_seq_fwd	CAT TGC CTG ACA CTG TGG AC
CTSS_cDNA_seq_rev	CGC CTC CAC AGC CTT TAT TC
IRES-F	TGG CTC TCC TCA AGC GTA TT
IRES-R	CCT CAC ATT GCC AAA AGA CG

3.1.16 Software

SOFTWARE	QUELLE
BD FACSDIVA™	BD Bioscience
Benchling	https://www.benchling.com
Bio-Rad CFX Maestro software v1.1	Bio-Rad
Biorender	https://biorender.com
CNVkit	https://github.com/etal/cnvkit
EndNote X8.2	https://www.endnote.com
FlowJo V10.8.1	https://www.flowjo.com/
GraphPad Prism 6.07	https://www.graphpad.com
ImageJ	https://imagej.net/Fiji
Inkscape 0.92	http://www.inkscape.org
MaxQuant (version 1.6.3.4)	https://www.maxquant.org/
Microsoft 365 Version 2210	https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365
NLS Mapper	http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp
nSolver 2.6.43	NanoString Technologies
OncoPrinter	https://www.cbioportal.org
OncoScan Console 1.3	https://www.thermofisher.com
R Studio (1.1.463/R 3.6.0)	https://www.r-project.org/

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Falls nicht anderweitig beschrieben wurden alle Suspensionszelllinien (B-NHL Zelllinien: Karpas422, DG75, HBL-1, Z-138) in RPMI-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) in einem 37 °C warmen Inkubator mit 5% CO₂ kultiviert. OCI-Ly8 (Ly8) wurden in IMDM mit 10% FBS kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage auf eine Zelldichte von 0,1 - 0,3 × 10⁶ Zellen pro mL eingestellt.

A20 B Zell-Lymphomzellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FBS, 1 x Pen-strep (gibco), 25 mM HEPES (Pan-biotech), 1 x GlutaMax (gibco), 1 x MEM NEAA (gibco) und 50 µM 2-Mercaptoethanol (gibco) kultiviert. Die adhärenente Zelllinie HEK293T (293T) wurde in DMEM mit 10% FBS kultiviert.

Die Identität der Zellen wurde durch short tandem repeat profiling (Eurofins) am 14.09.2020 für A20 Zellen und am 19.12.2022 für die anderen Zelllinien bestätigt. Alle Zelllinien wurden alle drei Monate mit dem MycoAlert PLUS Mykoplasmen-Nachweiskit (Lonza) negativ auf Mykoplasmen-Kontamination getestet.

Die Zellzählung wurde in 600 µL mit dem Vi-CELL® Cell Viability Analyser durchgeführt.

3.2.2 Patientendaten

Alle Studien wurden von den zuständigen institutionellen Aufsichtsbehörden, in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki, genehmigt. Alle Patienten hatten eine Einverständniserklärung unterschrieben, die auch molekulare Analysen umfasste.

3.2.2.1 Analyse von CTSS-Mutationen

Sequenzierungsdaten (hybrid-capture targeted DNA next generation sequencing) von 305 Patienten mit fortgeschrittenem FL der German Low Grade Lymphoma Study Group 2000 (GLSG2000) und der British Columbia Cancer Agency (BCCA) Kohorten konnten aus früheren Arbeiten des Labors verwendet werden (Pastore, Jurinovic et al. 2015) (**Abbildung 5A**). Alle Patienten waren therapiebedürftig und erhielten R-CHOP oder R-CVP als Erstlinientherapie. CTSS-Mutationen wurden gewertet, wenn eine Variant Allele Frequency ≥ 0,05 vorlag.

Zusätzlich konnten CTSS-Mutationen in einer weiteren publizierten, Kohorte von 174 Patienten mit FL (Validierungskohorte) analysiert werden (Tobin, Keane et al. 2019) (**Abbildung 5B**). Es wurden nur Patienten ausgewertet, die R-CHOP, R-CVP oder R-Bendamustin erhalten hatten.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

3.2.2.2 Nachweis der CTSS-Kopienzahl in Patientenproben

Insgesamt 146 Gewebeproben von Patienten der GLSG2000-Kohorte konnten für genomweite Kopienanzahl-Analyse mit Oncoscan FFPE CNV Assay verwendet werden (Qu, Li et al. 2019). Die Krebszellfraktion wurde mit dem Absolute-Algorithmus ermittelt (Carter, Cibulskis et al. 2012). Für weitere 140 Proben wurde wie in (Bararia, Hildebrand et al. 2020) berichtet die CTSS-Kopienzahl genomweit aus den NGS-Daten abgeleitet, wobei sowohl gezielte Reads als auch Off-Target-Reads (CNVkit 0.9.5) verwendet wurden. Die Darstellung von Patientenproben mit CTSS-Kopienzahlgewinn und/oder CTSS^{Y132}-Mutation wurde mit dem Oncoprint-Tool (Gao, Aksoy et al. 2013) durchgeführt (**Abbildung 5A**).

3.2.2.3 Analyse der Genexpression mit digital multiplex gene expression profiling (nCounter, NanoString)

Die digitale Multiplex-Genexpressionsprofilierung von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Biopsieproben von 53 Patienten der GLSG2000-Kohorte wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Hellmuth, Louissaint et al. 2018) (**Abbildung 5A**). Es wurden diejenigen Patienten ausgewählt, die POD24 hatten oder 5-Jahre rezidiv-frei waren (end-of-spectrum Kohorte). Die mRNA wurde mit dem ExpressArt FFPE Clear RNAready Kit (AmpTec) oder dem AllPrep FFPE (Qiagen) isoliert. Die mRNA (300 ng) wurde mit dem nCounter PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString) gemäß dem Herstellerprotokoll untersucht. Die Normalisierung erfolgte durch Subtraktion des Mittelwerts + 2 Standardabweichungen der Negativkontrolle als Grenzwert und Anpassung an das geometrische Mittel der definierten Positivkontrollen und definierten Housekeeping-Gene. Der Schwellenwert für die Normalisierung der Housekeeping-Gene wurde zur Qualitätskontrolle auf das 0,1-10-fache festgelegt.

Die Kohorte von Tobin et al. wurde zuvor auf *CD137*, *CD4*, *CD7*, *CD8A*, *TNF α* , *PD1*, *PDL1*, *PDL2*, *TIM3*, *LAG3*, *FOXP3* und *CD68* untersucht. *GAPDH*, *OAZ1*, *PGAM1*, *PGK1* wurden als Housekeeping-Kontrollen verwendet (Tobin, Keane et al. 2019). Von insgesamt 104 Patienten stand mRNA zur Verfügung (**Abbildung 5B**). Zur Bestimmung der CTSS-Expression in dieser Kohorte habe ich die mRNA (50 ng) mit dem 12-Gen nCounter® Elements™ XT Reagents Gen-Kit (NanoString) unter Verwendung derselben Housekeeping-Gene untersucht. Weiterhin habe ich die Expression von *GM-CSF*, *CXCL12*, *CXCL13*, *IFN-G*, *IL10*, *IL17A* und *IL4* untersucht. Die Oligonukleotide für diese Gene wurden mit dem NanoString nDesign™ Gateway entworfen und bei Integrated DNA Technologies (IDT) bestellt. Die Genexpressionsdaten wurden anhand der Standardeinstellungen in der Software nSOLVER 4.0 normalisiert.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

3.2.2.4 Analyse der Überlebensdaten

Zu 51 der Patienten aus der GLSG2000-Kohorte mit vorhandenen Genexpressionsdaten waren auch die klinischen Daten vorhanden und konnten daher für Kaplan-Meier-Diagramme verwendet werden (**Abbildung 5A**). Sie umfassten 51% Frauen (N=26; Durchschnittsalter 55,0 Jahre) und 49% Männer (N=25; Durchschnittsalter 55,4 Jahre).

Zu 104 der Patienten aus der real-life Validierungskohorte (Tobin, Keane et al. 2019) mit vorhandenen Genexpressionsdaten, standen auch Überlebensdaten für Kaplan-Meier-Diagramme zur Verfügung. 72 dieser 104 Patienten erhielten R-CHOP, R-CVP oder R-Bendamustin (**Abbildung 5B**). Darunter befanden sich 50% Frauen (N=36; Durchschnittsalter 58,8 Jahre) und 50% Männer (N=36; Durchschnittsalter 58,4 Jahre).

Für die Analyse des Patientenüberlebens und des POD24 wurden nur Patienten mit fortgeschrittenem FL untersucht, die eine Standard-Immunchemotherapie benötigten bzw. erhielten. Ereignisfreies Überleben (failure free survival, FFS), Gesamtüberleben (overall survival, OS) und POD24 wurden wie zuvor beschrieben berechnet (Jurinovic, Kridel et al. 2016, Tobin, Keane et al. 2019). Die Patienten wurden nach dem Vorhandensein von CTSS-Y132D-Mutationen ($CTSS^{Y132D}$), hoher CTSS-Expression ($CTSS^{hi}$), CTSS-Y132D-Mutationen oder hoher CTSS-Expression ($CTSS^{Y132D/hi}$) sowie CTSS-Wildtyp (WT) und nicht hoch exprimiert ($CTSS^{WT+low}$) stratifiziert. Zur Identifizierung von Fällen mit hoher bzw. niedriger CTSS-Expression wurde *k-means* clustering verwendet. Statistische Analysen und Datenvisualisierung wurden mit der Statistiksoftware R (Version 3.6.0) unter Verwendung der Pakete survival 2.44.1.1, survminer 0.4.4 und ggplot2 3.2.0 durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Kurven wurden mit dem Log-Rank-Test verglichen.

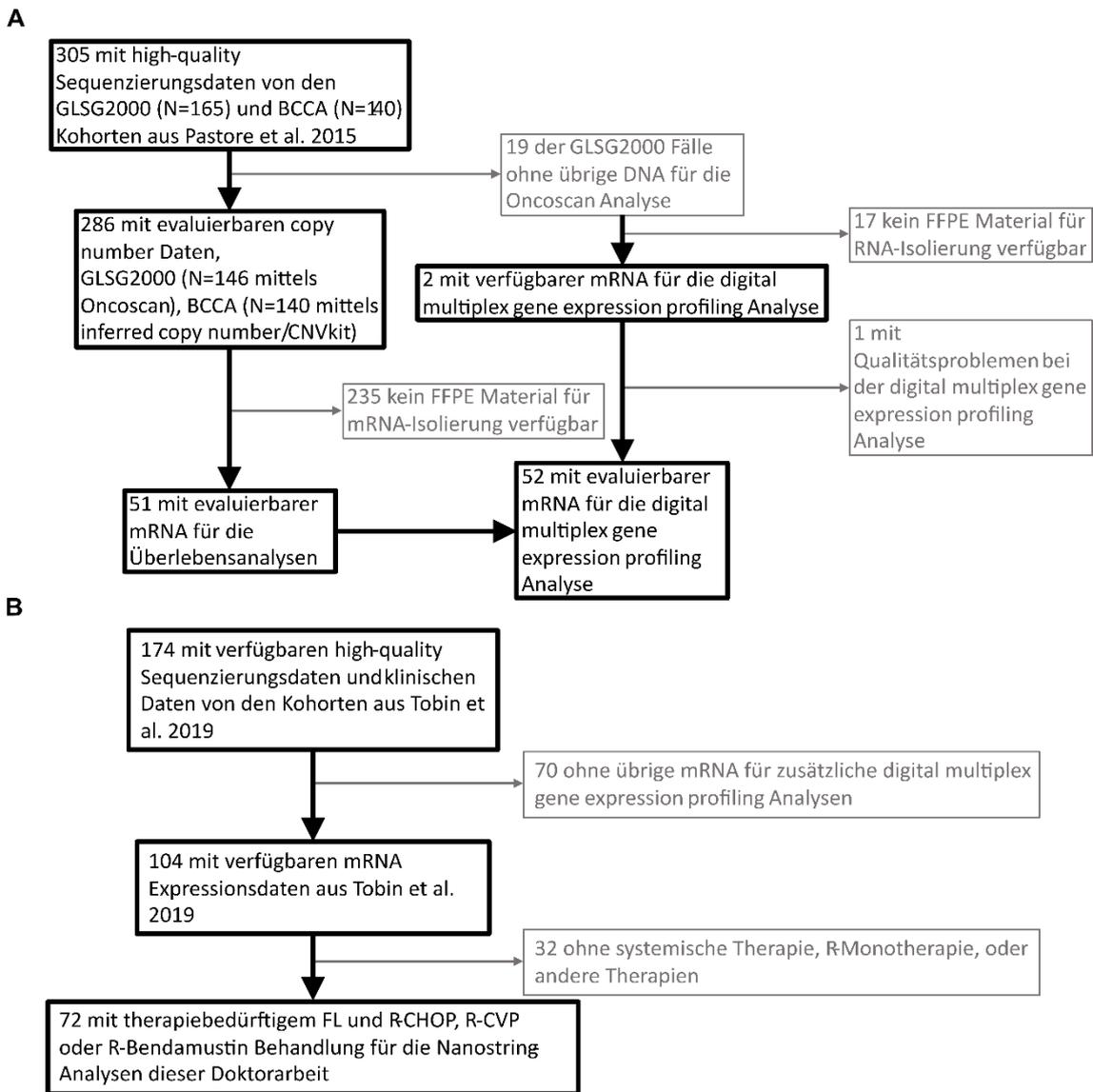


Abbildung 5 Übersicht über die Patientenproben.

Konsortendiagramme für die Proben der **A**) German Low-Grade Lymphoma Study Group (GLSG2000) und British Columbia Cancer Agency (BCCA) Kohorten (Pastore, Jurinovic et al. 2015) und der **B**) real-life Kohorte aus (Tobin, Keane et al. 2019). Schmale graue Rahmen mit dünnen Pfeilen visualisieren die jeweiligen Proben, die bei den Analysen ausgeschieden sind. FFPE = Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe.

3.2.3 Klonierung

3.2.3.1 Klonierung von pCIG und pMIG

$CTSS^{WT}$ und $CTSS^{Y132D}$ cDNA wurden von pDONOR201 in verschiedene Expressionsvektoren (pCIG-GW, pMIG-GW und pcDNA6) mittels Gateway®-Klonierung (ThermoFisher Scientific) kloniert.

3.2.3.2 Klonierung von FLAG-CTSS

Ein In-Frame-FLAG-Tag zwischen dem Signalpeptid (SP) und der pro-CTSS-Sequenz wurde in früheren Arbeiten des Labors mit PCR unter Verwendung von pcDNA6 CTSS^{WT} und der CTSS^{Y132D} Mutante als Vorlage eingefügt und in einen Shuttle-Vektor kloniert. Dazu wurde pcDNA6 CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} unter Verwendung von pDONOR201 CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} als Vorlage mit PCR amplifiziert und mit EcoRI und XhoI in pcDNA6 EV kloniert. Shuttle-Vektoren, die entweder CTSS^{WT}- oder CTSS^{Y132D}-Inserts enthielten, wurden mit SfiI verdaut, um CTSS in einen bidirektionalen Doxycyclin (Dox)-regulierten pTet EBO-GFP-Expressionsvektor zu klonieren. Die Insert-Sequenzen wurden mit Sanger-Sequenzierung bestätigt, wobei die in 3.1.1 aufgeführten Oligos (CTSS_Forward und CTSS_Reverse) verwendet wurden. Um die Expression des FLAG-CTSS-Expressionsvektors zu induzieren, wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 600 ng/mL Doxycyclin behandelt. Die Stimulation dauerte 48 Std, bevor die Zellen analysiert wurden.

3.2.3.3 Klonierung von CTSS-BioID2

CTSS^{WT}-, CTSS^{Y132D}-, CTSS C139A Mutanten (CTSS^{C139A}), CTSS C139A-Y132D Doppelmutanten (CTSS^{C139A-Y132D})-Inserts wurden mittels PCR aus den in 3.2.3.2 genannten Shuttle-Vektoren mit BamHI Restriktionsstellen versehen. PCR-Produkte und der Expressionsvektor (pBMN IRES Lyt2_ORF 10X GS Linker BioID2 HA; siehe Vector Map in Anhang 5) wurden anschließend für 60 min bei 37 °C BamHI verdaut und der linearisierte Expressionsvektor mit einer Unit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) für 60 min bei 37 °C behandelt und alles auf ein 1% Agarose-gel aufgetragen und die Banden aufgereinigt. Anschließend wurden die Inserts und der Expressionsvektor für 60 min bei 37 °C DpnI verdaut, 20 min bei 80 °C hitzedeaktiviert und die Inserts mittels T4 Ligase über Nacht in Eiswasser in den Expressionsvektor in einer 2:1 Ratio (100 ng Insert : 50 ng Expressionsvektor) ligiert. Die Ligation wurde am nächsten Tag für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und 2 µL in 25 µL E. coli (TOP10) transformiert und auf Ampicillin (Amp)-Agar ausplattiert. Es wurden jeweils mindestens 5 Kolonien Sanger-sequenziert, um eine Kolonie mit dem richtigen Insert und der richtigen Orientierung zu finden.

3.2.4 Virusproduktion

293T Zellen wurden 1 Tag vor der Transfektion mit einer Konfluenz von 50% in einer 10-cm-Schale in DMEM mit 10% FBS ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium mit Opti-MEM ohne FBS getauscht. Die Hüll- und Verpackung-Plasmide (für humane lentivirale Expressionsvektoren: psPAX2 (Addgene #12260) und pVSV-G,

(Addgene #138479). Für humane retrovirale Expressionsvektoren: gag/pol (Addgene #14887) und pVSV-G (Addgene #138479). Für murine retrovirale Expressionsvektoren: pCL-Eco (Addgene#12371) und der Expressionsvektor (Übersicht in 3.1.1) wurden wie in Tabelle 1 gezeigt in Opti-MEM verdünnt und mit 1,5 x [μg der zu transfizierenden DNA in μL] 1 mg/mL Polyethylenimin (PEI) gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben. Ein Tag nach der Transfektion wurde das Medium mit 10 mL DMEM 10% FBS ersetzt. Ein Tag darauf wurde der Überstand abgenommen und in einem 50 mL Falcon im bei 4 °C gelagert. Weitere 10 mL wurden zu den Zellen gegeben und einen weiteren Tag inkubiert bis erneut der zweite Überstand abgenommen wurde. Überstand 1 und 2 wurden gepooled, für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand mit einem 0,45- μm -Spritzenfilter gereinigt und das Virus anschließend für 24 Std bei 5000 g konzentriert.

Tabelle 1 Transfektionsmischung zur Virusproduktion je 10-cm-Schale.

PLASMID	MENGE/VOLUMEN
Humaner lentiviraler Expressionsvektor	10 μg
pVSV-G	3 μg
psPAX2	7 μg
PEI	30 μL
Humaner retroviraler Expressionsvektor	10 μg
pVSV-G	10 μg
Gag/pol	10 μg
PEI	45 μL
Maus retroviraler Expressionsvektor	10 μg
EcoPack	10 μg
PEI	30 μL

3.2.5 Transduktion

10^6 Zellen wurden in einer 12-Well-Platte in Medium ausgesät und das konzentrierte Virus wurde zusammen mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene zu den Zellen gegeben. Die Platte wurde dann bei 1.500 x g bei 32° C für 90 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen für 2 Std inkubiert, bevor das Medium ausgetauscht wurde. Die erfolgreiche Transduktion wurde mittels Western Blotting (siehe 3.2.11) überprüft.

3.2.6 Puromycin-Selektion

Transduzierte, Puromycin-resistente Zellen wurden mit 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin-Medium für 14 Tage selektiert. Dabei wurde das Medium alle 5 Tage durch frisches Puromycin-Medium getauscht. Zur Prüfung der Selektionswirksamkeit von Puromycin wurde eine untransduzierte Kontrolle verwendet.

3.2.7 RNA-Isolierung

Die RNA wurde unter Verwendung des Direct-zol™ RNA-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Dazu wurden 10^6 Zellen synchronisiert, geerntet und 1x mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde vorsichtig gevortext und 500 μ L TRI-Reagenz hinzugefügt. Die Proben wurden erneut gevortext und über Nacht bei -80°C eingefroren. Nach mindestens 24 Std wurde die RNA-Isolierung fortgesetzt. Die fertig isolierte RNA wurde in einem Spektralphotometer (NanoDrop) gemessen und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.8 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Die RNA wurde mit dem SuperScript® III First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific) in cDNA umgeschrieben. Für alle Bedingungen wurden gleiche Mengen an cDNA verwendet. Die Reaktion wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers und unter Verwendung von 1 μ g isolierter RNA und Random Hexamers in 10 μ L Reaktionsvolumen durchgeführt.

3.2.9 Synthese Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse

Die Genexpression wurde mit Hilfe von CTSS (Hs00175407_m1 CTSS) und B2M (Hs99999907_m1 B2M) TaqMan-Assays mit dem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) quantifiziert.

3.2.10 PCR und Sanger-Sequenzierung von CTSS

Die PCR-Primer wurden mit Primer3 (Untergasser, Nijveen et al. 2007) entworfen und die Sanger-Sequenzierung wurde bei GATC Biotech durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in 3.1.15 aufgeführt.

3.2.11 Immunoblotting

Für das Western Blots von Zelllysaten wurden 1×10^7 Zellen mit Radio-Immunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA) lysiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA-Assay (ThermoFisher Scientific) quantifiziert. Die Proteine wurden auf 12% SDS-PAGE-Gelen getrennt. Die Immunoblots wurden über Nacht bei 4°C mit einem primären Antikörper inkubiert, gefolgt von einem sekundären, mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Antikörper für eine Std bei Raumtemperatur. Verwendete Antikörper sowie deren Verdünnung sind Absatznummer 3.1.10 zu entnehmen.

Für CD74-Western Blots wurde vor der Entnahme der Lysate der Cathepsin-Inhibitor E-64 (Sigma, E3132) zugegeben (18 Std 7,5 μM für Karpas422, 36 Std 75 μM für DG75).

Für Western Blots nach LLOMe Behandlung wurden vor der Entnahme der Lysate 0.5×10^7 Zellen für 2 und 20 Std mit 100 μM LLOMe in 5 mL RPMI Medium behandelt.

Die Bandenintensitäten der Western Blots wurden mit ImageJ-Densitometrie quantifiziert und in Prism 9 aufgetragen.

3.2.12 Immunopräzipitation

Für die Immunpräzipitation von CTSS aus Karpas422 Zellen wurden 600 μg Zelllysate verwendet. Die Zelllysate wurden mit 1 x passivem Lysepuffer (PLB, Promega) hergestellt. 0,5 x PLB-Puffer, verdünnt in ddH₂O, wurde als Immunpräzipitationspuffer verwendet. Die Lysate wurden mit 2 μg Ziegen-IgG-Antikörper (Cell Signaling Technology) und Protein-G-Agarose-Beads (Sigma) vorgereinigt, während der CTSS-Antikörper 1 Std lang bei 4 °C an Protein-G-Agarose-Beads gebunden wurde. Anschließend wurde das vorgereinigte Lysat mit den Bead-gebundenen Antikörpern 2 Std lang unter ständiger Rotation bei 4 °C inkubiert. Bead-gebundene Immunpräzipitate wurden dreimal mit Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Die Immunpräzipitation von FLAG-markierten Proteinen mit magnetischen M2-Agarose-Beads (Sigma) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Kurz gesagt: 10 mg PLB-lysierte 293T Zellen wurden mit 50 μL Anti-FLAG-M2-Agarose-Beads in 0,5 x PLB-Puffer für 3 Std bei 4 °C inkubiert. Bead-gebundene Immunpräzipitate wurden einmal mit 0,5 x PLB-Puffer mit 200 mM NaCl, einmal mit 100 mM NaCl, einmal mit Immunpräzipitationspuffer und anschließend mit 50 mM Tris-Cl (pH 7,5) gewaschen. Die Proteine wurden von den Beads im 50 mM Tris-Cl-Puffer mit dreifachem FLAG-Peptid (Sigma Aldrich) gemäß den Anweisungen des Herstellers bei 4°C für 1 Std unter ständigem Schütteln eluiert. Das Eluat wurde mit einem silbergefärbten Gel analysiert, und die Bestimmung des Proteininhalts erfolgte anhand einer BSA Verdünnungsreihe (New England BioLabs).

Wenn das Immunpräzipitat direkt für einen Western Blot verwendet werden sollte, wurde es direkt in 50 μL 1 x Laemmli Sample Puffer (BioRad Cat.#1610747 mit 50 mM DTT) für 5 min bei 80 °C gekocht.

3.2.13 Cathepsin-Aktivitätstest

Die Cathepsin-Substratspaltungsaktivität wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 μL in einer 96-Well-Platte unter Verwendung von mit Amino-4-Trifluormethylcumarin markiertem Valin-Valin-Arginin (Z-VVR-AFC) als Substrat für CTSS (Cathepsin S Activity

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Fluorometric Assay Kit, BioVision) und dem mitgelieferten Reaktionspuffer (pH 5,5) aus dem Kit gemessen. Für den Test wurden folgende Enzyme verwendet: i) immunopräzipitiertes CTSS aus Karpas422 Zellen unter Verwendung des polyklonalen CTSS-Antikörpers, ii) gereinigtes FLAG-markiertes pro-CTSS aus 293T unter Verwendung von Anti-FLAG-Magnetbeads, iii) aktives CTSS-Enzym aus gereinigtem pro-CTSS nach 24-stündiger Inkubation in Reaktionspuffer bei 37°C. Das aktive Enzym führt zur Hydrolyse des Substrats, wodurch die Fluoreszenz des AFC-Produkts entsteht, die mit dem Glomax®-Fluorometer (Promega) bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen wurde. Der im Kit enthaltene FF-FMK wurde als CTSS-Inhibitor verwendet.

Zur Messung der CTSB-Aktivität diente Z-Arg-Arg-AMC, zur Messung der CTSH-Aktivität diente R-AMC und zur Messung Gesamt-Cathepsin-Aktivität diente Z-FR-AMC. Dazu wurden Zelllysate verschiedener Zelltypen mit und ohne shRNA-vermitteltem Stefin B (CSTB) knock-down bei 4°C auf dem Umlaufschüttler für 10 min bei 70 rpm mit 200 µg/mL Digitonin in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.0 hergestellt und anschließend 1:1 mit Substratpuffer (50 µM des jeweiligen Substrats und 5 mM Dithiothreitol (DTT) in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.0) vermischt und die Fluoreszenz des AMC-Produkts bei 37°C alle 5 min über 6 Stdh mit dem Glomax®-Fluorometer (Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 415-445 nm) aufgezeichnet. Bei der Auswertung wurde die Cathepsinaktivität entweder über die Zeit dargestellt oder direkt die Steigung des linearen Bereichs der Aktivität wie in (Repnik, Cesen et al. 2016) berechnet und als RFU (Relative Fluoreszenzeinheiten) angegeben.

3.2.14 *In vitro* Messung der autokatalytischen Umwandlungskinetik von pro-CTSS zu aktivem CTSS

Die Proteinkonzentrationen des eluierten FLAG-markierten Proteins wurden mit Qubit und durch silbergefärbte SDS-PAGE unter Verwendung von BSA als Standard bestimmt. Die Autokatalyse von pro-CTSS wurde bei 37°C in einem Volumen von 60 µL durchgeführt. Ein Zeitverlaufsexperiment wurde für die angegebenen Zeitpunkte (0-180 min) unter Verwendung von aufgereinigtem pro-CTSS durchgeführt. Jede Reaktion bestand aus 38,5 µL Reaktionspuffer (pH 5,5 BioVision), 25 µg/mL Dextransulfat und 100 ng des jeweiligen Pro-Enzym-Proteins. Aliquots von 60 µL wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 45, 180 min) aus der Reaktionsmischung entnommen, durch Zugabe von SDS-Probenpuffer denaturiert und 5 min bei 90°C gekocht. Die automatische Verarbeitung wurde mit einem silbergefärbten 12%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Die Bandenintensitäten wurden mittels ImageJ-Densitometrie quantifiziert.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

3.2.15 Herstellung von pro-CTSS, intermediate-CTSS und aktivem CTSS Wildtyp für die proteomische Analyse

Gereinigtes FLAG-markiertes pro-CTSS^{WT} wurde bei 37°C in BioVision-Puffer in einem Gesamtvolumen von 60 µL inkubiert. Jede Reaktion bestand aus 36 µL Reaktionspuffer (pH 5,5 BioVision) und 20 µL (200 ng) pro-CTSS^{WT}. Nach 3 Stdn Inkubation waren alle 3 CTSS-Formen (pro-, intermediate (int)- und aktives CTSS) vorhanden und die Proben wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und 5-minütiges Kochen bei 90 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proteine mit 50 mM DTT reduziert und mit 55 mM CAA alkyliert. Die anschließende 4-12%ige SDS-PAGE-Gelelektrophorese trennte CTSS in seinen 3 sichtbaren Formen auf. Insgesamt wurden 3 Replikate der pro-CTSS-Form, 4 Replikate der int-CTSS-Form und 4 Replikate der aktiven CTSS-Form hergestellt und untersucht. Die Proteine auf dem Gel wurden mit dem ThermoFisher Scientific™ Pierce™ Power Stainer (Kat. Nr. 22833) Coomassie-gefärbt, Banden wurden ausgeschnitten und mit dem X-TRACTA (Biozym) in 1,5-mL-Eppendorf-Röhrchen übertragen. Der Trypsin-Verdau im Gel wurde nach Standardverfahren durchgeführt (Shevchenko et al., 2006).

Für die massenspektrometrische Untersuchung von phosphorylierten Aminosäuren wurden die 293T Zellen mit 3 mal alle 12 Stdn mit 1 µM Phosphataseinhibitor (Pervanadat) während der Transfektion von pro-CTSS vorbehandelt. Anschließend wurde CTSS mit Anti-FLAG-Magnetbeads aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit einem 3xFLAG-Peptid in 50 mM Tris-Cl pH 7,4. Das eluierte FLAG-pro-CTSS konnte durch Inkubation bei 37°C und in Gegenwart von Dextransulfat innerhalb von 45 min in das aktive Enzym umgewandelt werden. Nach 15 min war das Zwischenprodukt auf SDS-Gelen sichtbar und die Banden konnten ausgeschnitten werden. Damit eine ausreichende Qualität der Proben für die Massenspektrometrie gewährleistet werden konnte, wurde der gesamte Prozess in einer keratinfreien Umgebung durchgeführt. Außerdem wurden den Proben vor dem Gellauf 50 mM Dithiothreitol (DTT) und 55 mM Chloracetamid (CAA) zugesetzt, um die enthaltenen Proteine zu reduzieren und zu alkylieren. In einem nächsten Schritt wurden die Banden mit Trypsin verdaut, um sie für die Massenspektrometrie vorzubereiten.

3.2.16 Immunopräzipitation gefolgt von Massenspektrometrie

Die LC-MS/MS-Probenvorbereitung, Datenerfassung und -analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christina Ludwig und Dr. Stephanie Wilhelm am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS), Freising, Bayern, Deutschland, durchgeführt.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

3.2.16.1 Massenspektrometrische Probenvorbereitung

Der In-Gel-Trypsin-Verdau aller Immunopräzipitate wurde nach Standardverfahren durchgeführt (Shevchenko, Tomas et al. 2006). Die Proben wurden auf einem Nu-PAGE™ 4%-12% Bis-Tris-Proteingel (ThermoFisher Scientific) für etwa 1 cm laufen gelassen und anschließend die noch nicht aufgetrennte Proteinbande ausgeschnitten und über Nacht mit Trypsin (Trypsin Gold, Massenspektrometriequalität, Promega) verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden vollständig getrocknet und in 25 µL Puffer A (2% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in H₂O von HPLC-Qualität) resuspendiert. Pro MS-Messung wurden 3 µL der Probe injiziert.

3.2.16.2 LC-MS/MS-Datenerfassung

Die LC-MS/MS-Datenerfassung der CTSS-Co-IP-Proben (CTSS_KO#F1, CTSS_KO#A2, CTSS_WT#A1, CTSS_WT#C9, CTSS_Y132D#E2, CTSS_Y132D#H41) wurde identisch durchgeführt wie bei FLAG-CTSS (Bararia, Hildebrand et al. 2020). Die Messungen wurden auf einem Dionex Ultimate 3000 RSLCnano System durchgeführt, das mit einem Q-Exactive HF-X Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) gekoppelt war. Die injizierten Peptide wurden auf eine Trap-Säule (ReproSil-pur C18-AQ, 5 µm, Dr. Maisch, 20 mm × 75 µm, manuell beladen) mit einer Flussrate von 5 µL/min in 100% Lösungsmittel A (0,1% Ameisensäure in HPLC-H₂O) gegeben. Nach 10 min Beladung wurden die Peptide auf eine analytische Säule (ReproSil Gold C18-AQ, 3 µm, Dr. Maisch, 450 mm × 75 µm, manuell beladen) übertragen und mit einem 50-minütigen Gradienten von 4% bis 32% Lösungsmittel B (0,1% FA, 5% DMSO in Acetonitril) in Lösungsmittel A (0,1% FA, 5% DMSO in HPLC- H₂O) bei einer Durchflussrate von 300 nL/min getrennt. Das Q-Exactive HF-X Massenspektrometer wurde im datenabhängigen Erfassungsmodus (DDA) und im positiven Ionisierungsmodus betrieben. MS1-Spektren (360-1300 m/z) wurden mit einer Auflösung von 60k bei einem AGC-Zielwert von $3 \times e^6$ und einer maximalen Injektionszeit (maxIT) von 45 msec aufgenommen. Es wurden bis zu 18 Peptidvorläufer für die Fragmentierung ausgewählt. Es wurden nur Vorläufer mit den Ladungszuständen 2 bis 6 ausgewählt, und es wurde ein dynamischer Ausschluss von 25 Sekunden aktiviert. Die Peptidfragmentierung wurde unter Verwendung der kollisionsinduzierten Dissoziation mit höherer Energie (HCD) und einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 26% durchgeführt. Die Breite des Fensters für die Isolierung der Vorläufer wurde auf 1,3 m/z eingestellt. Die MS2-Auflösung betrug 15.000 mit einer automatischen Verstärkungskontrolle (AGC) von $1 \times e^5$ und einer maximalen Injektionszeit (maxIT) von 25 msec (vollständiges Proteom).

3.2.16.3 LC-MS/MS-Datenanalyse und Visualisierung

Die Peptididentifizierung und -quantifizierung der Co-IPs erfolgte mit der Software MaxQuant (Version 1.6.3.4) und der darin enthaltenen Suchmaschine Andromeda. MS2-Spektren wurden gegen alle kanonischen humanen Proteinsequenzen gesucht, wie sie in der Swissprot-Referenzdatenbank annotiert sind (20205 Proteineinträge, heruntergeladen am 22. März 2016, intern annotiert mit PFAM-Domänen). Die Referenzdatenbank wurde zusätzlich mit der AS-Sequenz von CTSS^{Y132D} und mit üblichen Verunreinigungen (eingebaute Option in MaxQuant) ergänzt. Trypsin/P wurde als proteolytisches Enzym bei angegeben. Carbamidomethyliertes Cystein wurde als feste Modifikation eingestellt. Die Oxidation von Methionin und die Acetylierung am N-Terminus des Proteins wurden als variable Modifikationen festgelegt. Die Ergebnisse wurden auf der Ebene der Peptid-Spektrum-Übereinstimmung und auf der Proteinebene unter Verwendung eines Target-Decoy-Ansatzes mit umgekehrten Proteinsequenzen auf eine false discovery rate (FDR) von 1% eingestellt. Für die Proteinquantifizierung wurden die Intensitäten der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) verwendet, wobei mindestens 2 Peptide pro Protein identifiziert wurden. Die statistische Datenanalyse und -visualisierung wurde in Perseus (Version 1.5.6.0) durchgeführt. Fehlende Werte wurden aus der Normalverteilung separat für jede Spalte ersetzt (Breite = 0,3, Downshift = 1,8). Zwei von Einzelzellen abgeleitete Klone/biologische Replikate jeder Bedingung wurden gepoolt und mit dem Hintergrundrauschen von CTSS_KO Co-IPs verglichen.

Die LFQ-Intensitäten der Bedingungen CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} wurden mit einem zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test verglichen (FDR 5%, S0: 0,1).

Bei der LC-MS/MS-Datenanalyse und Visualisierung von FLAG-CTSS-IPs wurden die MS2-Spektren gegen die FLAG-markierte Cathepsin S-Aminosäuresequenz untersucht. Die Vorläufertoleranz wurde auf 4,5 ppm und die Fragmentionen-Toleranz auf 20 ppm festgelegt. Die minimale Peptidlänge wurde mit 7 Aminosäuren festgelegt. Die sichere und reproduzierbare Identifizierung und Quantifizierung von CTSS-Peptiden wurde durch Filtern der Peptid-Ergebnistabelle nach Peptiden sichergestellt, die in mindestens zwei Replikaten von mindestens einer CTSS-Form nachweisbar waren. Zusätzlich wurde auch eine Peptidintensitätsfilterung durchgeführt, d. h. nur CTSS-Peptide mit einer relativen Intensität > 0,2% im Vergleich zum intensivsten CTSS-Peptid in einer Probe wurden berücksichtigt. Insgesamt blieben 31 CTSS-Peptide übrig, die mit einer hohen Konfidenz in allen 11 CTSS-Proben nachweisbar waren. Diese wurden dann in der CTSS-Sequenz abgebildet.

3.2.17 BioID2 Proximity-Labeling

3.2.17.1 Vorbereitung der Zellen

Transduzierte Karpas422 und DG75 Zellen wurden mit Dynabeads™ mouse CD8 Lyt-2 (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers selektioniert. Dazu wurden 2 μL PBS gewaschene beads pro 2×10^6 Zellen verwendet. Die Expression von BioID2-gelabeltem CTSS wurde mit Western Blot für BioID2 und CTSS bestätigt. Die 1×10^6 Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und für 10 Zellverdopplungen (14 Tage) in SILAC Medium (Light: Leervektor, Medium: CTSS^{C139A}, Heavy: CTSS^{C139A-Y132D}) kultiviert, um den vollständigen Einbau der Aminosäureisotope zu gewährleisten.

3.2.17.2 Aufreinigung biotinylierter Proteine

1×10^8 SILAC-markierte, expandierte Zellen wurden für 24 Std mit 50 μM Biotin behandelt, 2x mit PBS gewaschen, mit den anderen Bedingungen (light, medium, heavy) gepooled, in 9 mL RIPA für 20 min auf Eis lysiert und anschließend bei 4°C und 15.000xg für 20 min zentrifugiert. Lysate wurden in 80 μL High-Capacity Streptavidin Agarose (ThermoFisher Scientific, Cat# 20359) bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Biotin-Streptavidin Komplexe 3x mit RIPA-Puffer gewaschen. Dazu wurden jeweils vorsichtig 10 mL RIPA-Puffer zu den beads gegeben und anschließend bei 4°C und 300g für 2 min zentrifugiert. Zuletzt wurden die Proteine in 50 μL 4 x LDS Sample Puffer mit 1% β -mercaptoethanol 10 min bei 95 °C eluiert, der Überstand mit Gelladungsspitzen in ein neues Eppendorf Tube überführt und die Proben zur MS-Analyse zu unseren Kollaborationspartnern der Arbeitsgruppe von Professor Oellerich nach Frankfurt eingeschickt.

3.2.17.3 Massenspektrometrie der BioID2-Konstrukte

Die LC-MS/MS-Probenvorbereitung, Datenerfassung und -analyse wurde in Zusammenarbeit mit Professor Thomas Oellerich, Dr. Carmen Döbele und Dr. Björn Häupl in der AG Oellerich im Fachbereich Medizin II, Hämatologie/Onkologie, Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland wie in (Phelan, Young et al. 2018) beschrieben durchgeführt.

Kurz gefasst wurden die Proteine über Gelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt und anschließend mit Trypsin verdaut. Die resultierenden Peptide wurden in Probenladepuffer resuspendiert und mit einem UltiMate 3000 RSLCnano HPLC-System (ThermoFisher Scientific) aufgetrennt, welches an ein Q-Exactive HF-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) gekoppelt war. MS1-Scans wurden mit einem Massenbereich von 350 bis 1.800 m/z und einer Auflösung von 60.000 bei 200 m/z aufgenommen. MS2-Scans

wurden mit einer Ausgangsmasse von 110 Th bei einer Auflösung von 15.000 bei 200 m/z und einer maxIT von 54 ms aufgenommen.

3.2.17.4 Analyse der Massenspektrometrie-Daten

Die Analyse der Massenspektrometrie Daten erfolgte mit der Software MaxQuant (Version 1.6.0.1). Die Massentoleranzen für Vorläufer- und Fragment-Ionen wurden nach der ersten Rekalibrierung auf 6 bzw. 20 p.p.m. festgelegt. Protein-Biotinylierung, N-terminale Acetylierung und Methioninoxidation wurden als variable Modifikationen zugelassen. Die Cystein-Carbamidomethylierung wurde als feste Modifikation definiert. Die minimale Peptidlänge wurde auf sieben Aminosäuren festgelegt, mit maximal zwei verpassten Abspaltungen. Die FDR wurde sowohl auf Peptid- als auch auf Proteinebene auf 1% festgelegt, wobei ein vorwärts- und rückwärts verketteter Decoy-Datenbankansatz verwendet wurde. Für die SILAC-Quantifizierung wurde die Multiplizität auf zwei oder drei für die doppelte (Lys + 0/Arg + 0, Lys + 8/Arg + 10) bzw. dreifache (Lys + 0/Arg + 0, Lys + 4/Arg + 6, Lys + 8/Arg + 10) Markierung festgelegt. Für die Quantifizierung der Peptide waren mindestens zwei Verhältniszahlen erforderlich. Die Option "Re-Quantifizierung" von MaxQuant wurde aktiviert. Die Daten wurden nach Peptiden mit geringem Vertrauen gefiltert.

Für die darauffolgenden Analysen wurden nur Proteine, die mindestens in einem Replikat ein log₂-Verhältnis gegenüber der Leervektor Kontrolle >1 weiter untersucht und mit den Co-IP Ergebnissen verglichen.

Als nächsten Schritt wurden die Proteine mit der „CRAPome Database“ (CRAPome V2.0 Daten von April, 2016) gefiltert (Mellacheruvu, Wright et al. 2013) mit einem cut-off von 5% (alle Proteine die häufiger als 5% in öffentlich zugänglichen CRAPome Datensätze auftauchen) gefiltert. Die übrigen Proteine wurden dann manuell in www.uniprot.org nach Funktion und Genontologie (GO) ausgewählt.

Die ausgewählten Proteine wurden anschließend in <https://david.ncicfcrf.gov> hochgeladen und mit Hilfe des Functional Annotation Tools automatisiert spezifischen Gruppen zugeordnet. Alle Einstellungen wurden auf „default“ belassen.

3.2.18 Tumorinokulation und Tierstudien

Die Tumorinokulation wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. David Weinstock am Dana-Farber-Cancer-Institute (Boston/MA) von Christopher Trevisani durchgeführt.

BALB/c-Mäuse (N=2) wurden 10 Tage vor der Isolierung ihrer Milz und der Herstellung von Milzzellensuspensionen mit 5×10^6 roten Blutkörperchen vom Schaf (SRBCs) in PBS in die laterale Schwanzvene injiziert, wie zuvor beschrieben (Yam 2013).

A20-Tumorzellen (Gruppe I: 1×10^6 und Gruppe II: 1×10^5) wurden im Verhältnis 5:1 mit Milzzellen (Gruppe I: $0,2 \times 10^6$ und Gruppe II: $0,2 \times 10^5$) gemischt und die Zellmischungen wurden in PBS mit 20% Matrigel resuspendiert und subkutan in die rechte Flanke injiziert. Gruppe I bestand aus N=6 Mäusen pro Kohorte (EV vs CTSS^{hi} vs CTSS^{Y132D}), Gruppe II aus N=3 Mäusen pro Kohorte. Sobald die Tumore sichtbar waren, wurde die Tumorgöße alle 2 - 3 Tage gemessen (Volumen = (Länge \times Breite²)/2). Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn das Tumolvolumen $>500 \text{ mm}^3$ war oder nach maximal 21 Tagen in Gruppe I. In Gruppe II wurden alle Mäuse am Tag 18 unabhängig von ihrer Tumorgöße euthanasiert. Der Versuchsleiter war während des Versuchs und bei der Bewertung der Ergebnisse gegenüber der Gruppenzuordnung verblindet.

3.2.19 Isolierung der Tumore

Nach Euthanasie der Mäuse wurden die Tumore isoliert. Ein Tumorstück wurde 48 Std lang in 10% Formalin fixiert und dann für die IHC-Färbung in 70% Ethanol überführt. Einzelzellsuspensionen wurden mit dem gentleMACS-Dissoziator hergestellt. Die Zellen wurden gezählt und ein Eppendorf Tube der Einzelzellsuspension für die Durchflusszytometrie in 10% DMSO-FBS eingefroren, ein weiteres Tube wurde für für Immunoassays (Luminex®) -Analyse eingefroren (siehe unten).

3.2.20 Durchflusszytometrie

3.2.20.1 Durchflusszytometrie der Maustumore

Die homogenisierten Tumorproben wurden aufgetaut und die Zellen mit Trypanblau-Lösung 0,4% (Gibco) mit einem Hämozytometer gezählt. Mindestens $0,2 \times 10^6$ viable Zellen wurden in $1 \times \text{DPBS}$ (Gibco) resuspendiert und mit dem ZombieUV Fixable Viability Kit (BioLegend) gemäß den Herstellerrichtlinien gefärbt. Zeitgleich wurden CD16/CD32 mit Maus BD FcBlock (BD Biosciences) blockiert. Dann wurden die extrazellulären Marker in einer 100- μl -Antikörpermischlösung mit MACS-Puffer (Miltenyi Biotec) für 15 min bei RT aufgetragen. Schließlich wurden die Proben mit PBS-FA 1% fixiert und in einem Cytoflex LX Durchflusszytometer (Beckman Coulter) analysiert, wobei mindestens 10000 lebensfähige Zellen erfasst wurden. Die Datenanalyse wurde in der Software FlowJo v10 unter Verwendung des Flächenparameters in allen Filtern durchgeführt.

Zur Identifizierung der Immunpopulationsinfiltrate in den Tumoren wurden die folgenden Antikörper (eBioscience - ThermoFisher Scientific) verwendet: CD19 (Klon #eBio1D3), konjugiert mit eFluor660, NK1.1 (Klon #PK136), konjugiert mit Phycoerythrin (PE), TCR- β (Klon #H57-597), konjugiert mit Alexa Fluor (AF) 700, CD4 (Klon #RM4-5), konjugiert mit Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP)-Cyanin (Cy) 5.5, und CD8 α (Klon #53-6.7), konjugiert mit Brillantviolett (Bv) 763.

3.2.20.2 Durchflusszytometrie für Annexin V

Zur Bestimmung des Zelltods über Durchflusszytometrie wurde eine Annexin V-Färbung mit dem BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit durchgeführt. Annexin V bindet an negativ geladene Phosphatidylserin, das apoptotische Zellen in der Plasmamembran freisetzen. Zusätzlich wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, um Zellkerne zu färben.

Die Annexin V Färbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden behandelte Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 1x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 200 μ L 1:10 verdünnten Annexin V Binding Puffer mit 3,5 μ L Annexin V-APC resuspendiert und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 2 μ L DAPI exakt 30 Sekunden vor jeder Messung hinzugefügt und der Zelltod mittels FACS bestimmt. Aus dem Forward- und Sideward-scatter wurden alle Ereignisse ausgewählt und AnnexinV-APC wurde gegen DAPI aufgetragen. Durch die Kombination von beiden Färbungen, lassen sich die Zellen in 3 Quadranten einteilen: viable Zellen (AnnexinV⁻DAPI⁻), frühe apoptotische Zellen (AnnexinV⁺DAPI⁻), und späte apoptotische Zellen (AnnexinV⁺DAPI⁺).

3.2.20.3 Maus-Tumor-Immunoassay (Luminex®100/200™ System)

10 mg tiefgefrorene Mäusetumorstücke aus Gruppe II wurden mit passivem Lysepuffer (PLB) lysiert und der IFN- γ -Gehalt mit einem mausspezifischen Bio-Plex Pro Reagent Kit 5 (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Der Gesamtproteingehalt wurde anhand einer Standardkurve für Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt, und 100 μ g jedes Tumorlysats wurden für den Test verwendet.

3.2.21 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) primärer Patientenproben (vor Behandlung) wurde in Kooperation mit Professor Wolfram Klapper und Dr. Julia Richter der Hämatopathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel mit einem automatischen IHC-Zellfärbegerät (BondMax, Leica) durchgeführt. Der CD4-Gehalt wurde durch visuelle Inspektion und Zählung der positiven Zellen unter 100 Zellen innerhalb eines

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

neoplastischen Follikels ermittelt. Die Gefäßdichte wurde durch Zählen aller CD34-positiven Kapillarstrukturen in einem Sichtfeld mit 550 μm Durchmesser (entsprechend einer 400-fachen Vergrößerung) bestimmt. Die folgenden Antikörper wurden für humanen Proben verwendet: CD4 1:25 (Novocastra), CD34 1:700 (Beckman-Coulter). Für die Korrelation der IHC mit der von digital multiplex gene expression profiling abgeleiteten Genexpression korrigierten ich die Expression um die Krebszellfraktion (CCF), indem ich die Digital multiplex gene expression profiling-Zahl durch $(1-\text{CCF})$ teilte.

Die IHC Formalin-fixierter Mastumore der Gruppe II wurde in Kollaboration mit Professor Martina Rudelius der LMU München mit einem automatischen IHC-Zellfärbegerät (BenchMark Ultra, Ventana) durchgeführt. Für die Mastumore wurden die folgenden Antikörper verwendet: CD4 1:500 (Abcam), CD8a 1:200 (CST), CD45R/B220 1:150 (ThermoFisher Scientific), Ki-67 1:200 (Cell Marque).

3.2.22 Berechnungsmethoden für die Molekulardynamik

Die Berechnungen der Molekulardynamik wurden in Kollaboration mit Dr. Menyhardt Sarosi am Zentrum für Informationsdienste und Hochleistungsrechnen (ZIH) der Technischen Universität Dresden durchgeführt.

Die Kristallstruktur der CTSS^{C139A}-Mutante des humanen pro-CTSS wurde von der Protein Data Bank (PDB-Code: 2C0Y) heruntergeladen (Kaulmann, Palm et al. 2006). C139 und die fehlenden AS 108-113 wurden mit dem UCSF Chimera-Paket und Modellierer (Sali and Blundell 1993, Pettersen, Goddard et al. 2004) eingefügt. Um die CTSS^{Y132D}-Koordinaten zu erzeugen, wurde mit dem UCSF Chimera-Paket (Pettersen, Goddard et al. 2004) eine Punktmutation eingeführt. Es wurde das ASP-Rotamer mit der höchsten Wahrscheinlichkeit gemäß der Dunbrack-library verwendet (Dunbrack 2002). Alle Aminosäurereste mit polaren Seitenketten wurden auf pH 5,5 gemäß den Bedingungen eingestellt, die für die Umwandlungs- und Aktivitätsassays verwendet wurden. Das katalytische Nukleophil CTSS^{C139} wurde in seiner deprotonierten anionischen Form eingesetzt (Erez, Fass et al. 2009). Das ff14SB-Molekularmechanik (MM)-Kraftfeld wurde für alle AS-Reste verwendet (Maier et al., 2015). Cl⁻-Gegenionen wurden hinzugefügt, um die Systeme zu neutralisieren. Jedes System wurde in eine voräquilibrierte OPC3 Wasserbox platziert (Izadi and Onufriev 2016). Die kristallographischen Wassermoleküle wurden in die Lösemittelboxen aufgenommen, die mindestens 9 Å von den gelösten Atomen entfernt waren. Die Kraftfeldparameter und die Cystein-Disulfid-Bindungen wurden mit dem Programm leap des Pakets AmberTools17 eingestellt. Die Äquilibrierung der Systeme und die MD-Simulationen folgten einem bereits veröffentlichten Protokoll (Bararia, Kwok et al. 2016). Eine zusätzliche 10-ns-MD-Simulation ohne Beschränkungen wurde

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

im isothermisch-isobaren (NPT) Ensemble durchgeführt, um die Systeme weiter auszugleichen. Produktions-MD-Simulationen wurden für 100 ns ausgeführt und mit der GPU-beschleunigten Version des AMBER12 pmemd-Codes (Gotz, Williamson et al. 2012, Salomon-Ferrer, Gotz et al. 2013) auf einem Bull Cluster durchgeführt.

3.2.23 Single-cell RNA-seq mit primären Patientenproben

Die Analysen der single-cell RNA-seq Daten für die *CTSS*- und *CSTB*-Genexpression wurden von Dr. Sarah Häbe wie in der Publikation (Haebe, Shree et al. 2021) beschrieben durchgeführt.

3.2.23.1 Patienten-Kohorte und Sequenzierung der Proben

Kurz zusammengefasst wurden von 10 Patienten mit FL Feinnadelaspirationsproben (FNA-Proben) entnommen. Einzelzellsuspensionen jeder Probe wurden mit Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-seq) untersucht. Hierfür wurden scRNA-seq-Libraries mit dem Chromium Single-Cell 5' Library and Gel Bead Kit und dem Chromium Single-Cell V(D)J Enrichment Kit (10x Genomics) hergestellt. Für die initiale Auswertung der scRNA-seq-Daten wurde das Programm Cell Ranger (Version 3; 10x Genomics) verwendet. Anschließend wurden die Daten anhand einer Qualitäts-metrik gefiltert.

3.2.23.2 Analyse der scRNA-seq Daten

Die scRNA-seq-Daten aller 20 Tumorproben wurden zusammengefasst und mit dem R-Paket Seurat (Version 3.1.1) normalisiert und geclustert. Die unterschiedliche Sequenziertiefe einzelner Libraries wurde vereinheitlicht, indem "nCount_RNA" als Parameter in die Funktion "ScaleData" mit aufgenommen wurde. Zur Visualisierung aller Zellen wurde Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) verwendet. Differenzielle Expressionsanalysen wurden ebenfalls mit dem R-Paket Seurat (Version 3.1.1) durchgeführt. Differenziell exprimierte Gene wurden ausgewählt, wenn sie in $\geq 20\%$ der Zellen in mindestens einem Cluster exprimiert wurden sowie einen logarithmische fold-change $\geq 0,2$ und einen Bonferroni-bereinigten P-Wert von $< 0,05$ unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests aufwiesen.

Maligne und nicht maligne B Zellen wurden anhand von verschiedenen Methoden identifiziert. Während die Tumorzellen in der UMAP ein patienten-spezifisches Cluster bilden, clustern die nicht-malignen B Zellen von allen Patienten zusammen. Des Weiteren weisen die patienten-spezifischen Cluster eine monoklonale B Zell Population auf, sprich alle Tumorzellen exprimierten das gleiche Leichtketten-Gen, während die normalen B Zellen polyklonal waren.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Weitere Informationen zu den scRNA-seq-Daten sind in (Haebe, Shree et al. 2021) veröffentlicht.

3.2.24 Quantifizierung und statische Analyse

Für jeden Versuch wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungen analysiert und die gepoolten Daten, sofern nicht anders angegeben als Mittelwert \pm SD dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 9 Version 9.3.1 verwendet. Für den Vergleich von nur zwei Gruppen wurde ein Student t-Test durchgeführt. Beim Vergleich von mehr als zwei Testbedingungen wurde ein ANOVA-Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Details zu den jeweiligen Tests befinden sich in den zugehörigen Abbildungsunterschriften. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.2.25 Berechnung der nuklearen Translokation von Cathepsinen (NLS)

Zur Berechnung der Kernlokalisierungssignale (NLS) wurde das online-tool NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) verwendet und die AS-Sequenzen aller Cathepsine hochgeladen. In den Einstellungen wurde kein Filter angewandt, damit auch Peptide mit cNLS Scores < 5 (unwahrscheinliches NLS) sichtbar werden. mit einem cNLS Mapper Score > 5 .

3.2.26 Verfügbarkeit von Daten und Code

Die in dieser Studie referenzierten Daten sind in der Gene Expression Omnibus-Datenbank unter den Zugriffscodes GSE66166 und GSE62246 verfügbar. Zusätzliche Genexpressionsdaten, die für diese Studie generiert wurden, sind bei GEO unter den Zugangscodes GSE147033 und GSE147125 verfügbar.

Die Kristallstruktur der C139A-Mutante des menschlichen pro-CTSS ist in der Protein Data Bank (PDB-Code: 2C0Y) verfügbar.

Die massenspektrometrischen Proteomdaten wurden beim ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) über das PRIDE-Partner-Repository mit dem Dataset Identifier PXD014612 hinterlegt.

Einzelheiten zur DNA-Sequenzierung aller CTSS-Mutationen sind in Tabelle S3 in (Bararia, Hildebrand et al. 2020) aufgeführt. Die Daten sind nicht öffentlich zugänglich, da sie Informationen enthalten, die die Privatsphäre oder die Zustimmung der Forschungsteilnehmer gefährden könnten. Die ausdrückliche Zustimmung zur Hinterlegung der Rohdaten für die Sequenzierung konnte von den Patienten nicht eingeholt werden.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

4. Ergebnisse³

4.1 Molekulare Mechanismen der Cathepsin S Hyperaktivität

4.1.1 CTSS-Mutationen bei FL

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden diagnostische Tumorbiopsien von Patienten mit fortgeschrittenem FL aus Deutschland und Kanada unter Verwendung eines target capture bait sets, das CTSS in voller Länge enthielt, sequenziert (Pastore, Jurinovic et al. 2015). Unter 305 Fällen identifizierten wir bei 23 FL (8%) somatische CTSS-Mutationen mit einer Varianten-Allelfrequenz (VAF) von $\geq 5\%$. Die meisten Mutationen waren der Stelle CTSS^{Y132} (19/23) und bewirkten hauptsächlich einen Aminosäure-Austausch von Y (TAT) zu D (GAT) (16/19) (Bararia, Hildebrand et al. 2020) (**Abbildung 6A**). 146 Proben der Kohorte wurden mit Hilfe von Oncoscan auf deren copy number Alterationen (CNA) untersucht. Daraus konnte für 12 der 19 CTSS^{Y132}-mutierten Fälle eine Krebszellfraktion-bereinigte Variant-Allele-Frequenz berechnet werden. Diese Analyse ergab, dass 5 Mutationen klonal (42%) und 7 Mutationen subklonal (58%) waren. Alle subklonalen CTSS^{Y132}-Mutationen führten zu einem CTSS^{Y132D} Aminosäureaustausch (**Abbildung 6B**). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass CTSS-Mutationen rekurrent sind, sich am Mutations-Hotspot CTSS^{Y132} häufen und subklonal sein können.

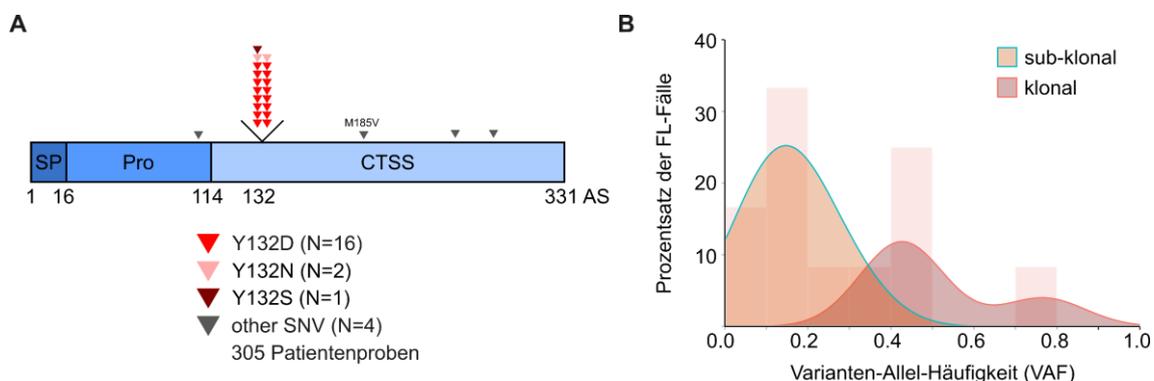


Abbildung 6 CTSS-Mutationen bei FL sind rekurrent, meist subklonal und häufen sich am Mutations-Hotspot CTSS^{Y132}.

A) Verteilung und Häufigkeit von CTSS-Mutationen aus einer Kohorte von 305 FL aus einer zuvor berichteten Kohorte (Pastore, Jurinovic et al. 2015). Die schematische Struktur von CTSS zeigt die Signalpeptid-(SP), Propeptid-(Pro) und die aktive-CTSS-Domäne; aa, Aminosäure. **B)** Krebszellfraktion (CCF)-korrigierte Varianten-Allel-Häufigkeiten (VAFs) von CTSS^{Y132}-Mutationen. CCFs standen für 12 von 19 FL mit CTSS^{Y132}-Mutationen zur Verfügung. Auszug aus Figure 1 meiner Veröffentlichung (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

³ Die Ergebnisse 4.1 – 4.6 wurden 2020 in Bararia und Hildebrand et al. in Cell Reports publiziert

4.1.2 Auswirkungen der CTSS^{Y132D}-Mutation auf die *in vitro*-Substratspaltungsaktivität

Die Ergebnisse einer früheren Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe suggerierten einen gain-of-function Phänotyp der CRISPR/Cas9 modifizierten Zelllinien (Stolz 2021). Daher habe ich die modifizierten Karpas422 und DG75 Zellen detaillierter untersucht. Von Einzelzellen abgeleitete Karpas422 CTSS^{Y132D}-Mutantenklone (#E2 und #H41) zeigten im Western Blot und in der dazugehörigen Proteinquantifizierung durchweg, und wie in bereits in (Stolz 2021) gezeigt, ein erhöhtes Verhältnis von aktivem CTSS (24 kD) zu pro-CTSS (36 kD) (**Abbildung 7A+B**). Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR zeigte, dass die erhöhten Proteinkonzentrationen von aktivem CTSS in den Zellen der CTSS^{Y132D} Mutante nicht auf Unterschiede in den CTSS-mRNA-Expression zurückgeführt werden konnten (**Abbildung 7B**). Als Kontrolle verwendete ich CRISPR/Cas9 generierte CTSS-Knock-out Karpas422 (KO) und DG75 Zellen (#2A1) aus der vorherigen Doktorarbeit (Stolz 2021). Auch in einer anderen B-NHL Zelllinie (DG75 mit CTSS^{KO}, #2A1) zeigte die Überexpression von CTSS^{WT} oder CTSS^{Y132D} im Western Blot ein erhöhtes Verhältnis von aktivem CTSS zu pro-CTSS für die CTSS^{Y132D}-Mutation (**Abbildung 7C**).

Als nächstes wollte ich die *in vitro* proteolytische Aktivität von CTSS quantifizieren. Dazu reinigte ich CTSS aus Karpas422 Zellen mit oder ohne die CTSS^{Y132D}-Mutation mittels Immunpräzipitation mit einem polyklonalen Anti-CTSS-Antikörper auf. Immunpräzipitate zeigten vergleichbare Proteingehalte von CTSS und pro-CTSS (**Abbildung 7D**). Ich verwendete diese Immunpräzipitate zur Spaltung von Z-VVR, einem synthetischen CTSS-Substrat, das mit dem Fluorochrom AFC markiert ist. Immunpräzipitate von CTSS^{Y132D} Karpas422 Zellen zeigten eine deutlich erhöhte Substratspaltungskinetik, die im Vergleich zu CTSS^{WT} nach 16 Stdn etwa das Dreifache erreichte (**Abbildung 7E**). Die Zugabe des CTSS-Inhibitors E-64 führte zu einer vollständigen Hemmung der proteolytischen Aktivität sowohl von CTSS^{Y132D} als auch von CTSS^{WT}.

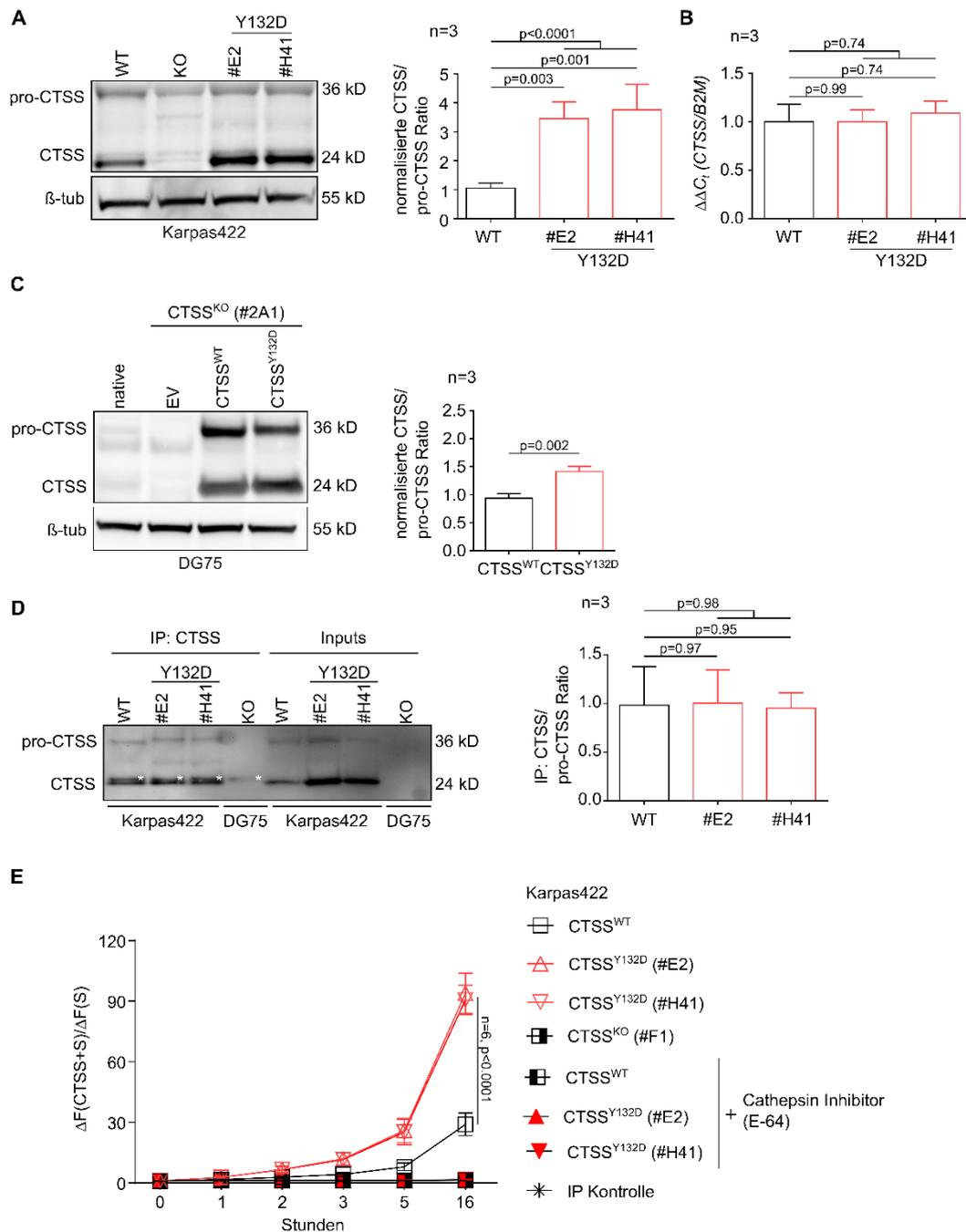


Abbildung 7 CTSS^{Y132}-Mutationen sind Gain-of-Function und erhöhen die Aktivität der Substratspaltung.

A) Western Blot von Karpas422 Zellen mit CTSS-Wildtyp (WT) oder CRISPR-Cas9 gezüchteten Einzelzellklonen mit CTSS^{Y132D} (#E2 und #H41) oder CTSS Knock-out (KO) mit normalisierter Ratio von gespaltenem CTSS/pro-CTSS-Proteingehalt aus 3 verschiedenen Western Blots. **B)** qRT-PCR der jeweiligen CTSS-mRNA; $\Delta\Delta C_t$, Unterschied (CTSS gegenüber B2M-Kontrolle). **C)** Ähnlich wie (A) mit CTSS^{WT} oder CTSS^{Y132D}, die in DG75-CTSS^{KO} Zellen re-exprimiert wurden. **D)** Western Blot einer CTSS-Immünpräzipitaten (IP) aus den Zellen von (A) mit normalisierten Ratios von aktivem CTSS/pro-CTSS, aus 3 verschiedenen Western Blots. DG75 CTSS^{KO} Zellen wurden als negativ-Kontrolle verwendet. Sternchen kennzeichnen leichte Immunglobulin G (IgG)-Ketten, die 1 kD über CTSS liegen. **E)** CTSS-Substratspaltung über 24 h. Z-VVR-AFC wurde als CTSS-Substrat verwendet; E-64 wurde als Cathepsin-Inhibitor eingesetzt. Ziege IgG Antikörper ohne Antigenspezifität wurde als negative Kontrolle für die IP verwendet. Jeder Zeitpunkt von 6

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

unabhängigen IPs wurde zweimal gemessen. Die gepoolten Daten aus biologischen Replikaten (n) sind dargestellt als Mittelwert \pm SD in den Abbildungen 2A-2D; p-Werte sind aus dem ungepaarten Student's t-Test. Die ganze Abbildung wurde übernommen aus (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

4.1.3 Einfluss der CTSS^{Y132D}-Mutation auf die autokatalytische CTSS-Aktivierung

Um den Mechanismus der erhöhten Proteaseaktivität zu verstehen und um mutations-spezifische Unterschiede in der CTSS-Umwandlungskinetik von pro- zu aktivem CTSS zu quantifizieren, entwickelten wir eine Strategie, um nur pro-CTSS in voller Länge aufzureinigen. Damit die korrekte Kompartimentalisierung und die richtige Proteinfaltung gewährleistet werden konnten, wurde in früheren Arbeiten des Labors eine einzelne FLAG-tag-Sequenz zwischen SP und pro-CTSS eingefügt (**Abbildung 8A**). Dazu habe ich FLAG-tagged pro-CTSS^{WT} und FLAG-tagged pro-CTSS^{Y132D} in einen Tetracyclin-kontrollierten Expressionsvektor kloniert und transient in 293T Zellen exprimiert. Die Behandlung mit Doxycyclin resultierte in vergleichbaren Leveln an FLAG-pro-CTSS^{WT} und FLAG-pro-CTSS^{Y132D} (**Abbildung 8B**). Ein Pull-down mit magnetischen Anti-FLAG beads ergab hochreine pro-CTSS^{WT} und pro-CTSS^{Y132D}-Proteine (**Abbildung 8C**, linke Seite). Diese wurden verwendet, um erneut die erhöhte Proteaseaktivität von CTSS^{Y132D} über die Zeit nachzuweisen (**Abbildung 8C**, rechte Seite). Der steilere Anstieg von CTSS^{Y132D} flachte dann nach 2 bis 4 Std ab. Wenn ich zuerst vergleichbare Mengen an aufgereinigtem pro-CTSS vollständig in aktives CTSS umwandelte (**Abbildung 8D**, linke Seite) und dann die Substratspaltungsaktivität testete, konnte ich keine Unterschiede zwischen CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} feststellen (**Abbildung 8D**, rechte Seite).

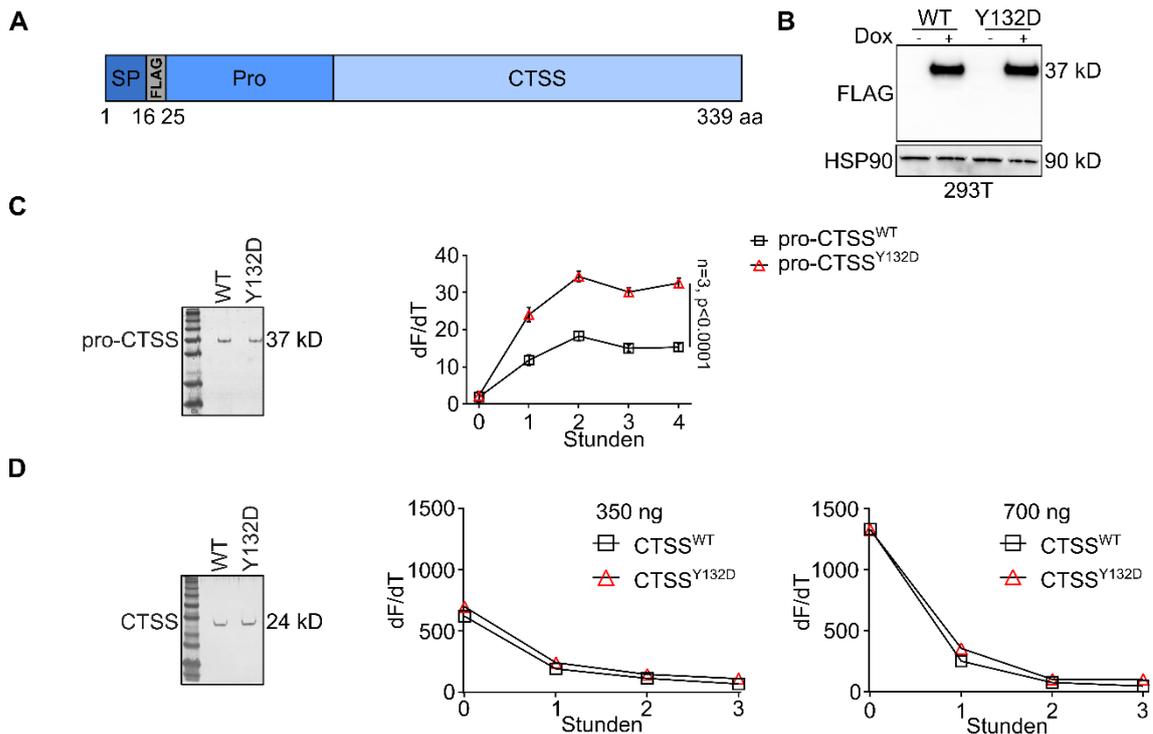


Abbildung 8 Aufgereinigtes CTSS^{Y132D} besitzt eine höhere Proteaseaktivität als CTSS^{WT}.

A) Schematische Darstellung von CTSS in voller Länge mit FLAG zwischen SP und Pro-Enzym. **B)** Western Blot von HEK293T Zellen (293T) mit Tetrazyklin-induzierbarem FLAG-tagged pro-CTSS (WT oder Y132D). **C)** CTSS-Substratspaltungs-Assay von 3 unabhängig voneinander gereinigten Proteinen über 4 Std unter Verwendung von gereinigtem pro-CTSS (Y132D versus WT), visualisiert in einer silbergefärbten SDS-PAGE Gel; dF/dt, Geschwindigkeit der Reaktion. **D)** CTSS-Substratspaltungsaktivität von vollständig umgewandeltem CTSS (WT und Y132D) für zwei verschiedene Konzentrationen (350 ng, 700 ng). Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Daraus leiteten wir ab, dass die gesteigerte Proteaseaktivität von CTSS^{Y132D} aus Unterschieden bei der Umwandlung von pro-CTSS zu CTSS resultierte. Daher untersuchte ich im nächsten Schritt die autokatalytische Umwandlungskinetik von pro-CTSS zu CTSS genauer, unter Verwendung von katalytischen (d. h. endolysosomal-ähnlichen) Bedingungen, wie zuvor beschrieben (Vasiljeva, Dolinar et al. 2005). SDS-PAGE und Silberfärbung bestätigten eine beschleunigte autokatalytische Umwandlung von pro-CTSS in aktives CTSS (**Abbildung 9A**). Um die relativen Unterschiede in der Umwandlungskinetik zu quantifizieren, führte ich in 3 unabhängigen Replikaten eine Densitometrie durch. Die für die Umwandlung von 50% des pro-CTSS erforderliche Zeit verringerte sich von 17 min bei CTSS^{WT} auf 11 min bei CTSS^{Y132D} (**Abbildung 9B**).

4.1.4 Molekulare Simulationen und Massenspektrometrie mit CTSS^{Y132D}

Wie genau CTSS^{Y132}-Mutationen die Proteaseaktivität erhöhen, war damit aber nicht geklärt. Ein Strukturmodell aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass der CTSS^{Y132}-Rest eine Wasserstoffbrücke mit CTSS^{H79} des Propeptids bildet

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

(**Abbildung 9C**). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass die erhöhte Proteaseaktivität von CTSS^{Y132D} aus der Auflösung der stabilen Wasserstoffbrücke resultiert. Um dies zu untersuchen, habe ich CTSS^{H79} zu CTSS^{A79} mutiert, um so von Seiten des Propeptids die Brücke aufzulösen, konnte allerdings keine Änderung in der Proteaseaktivität feststellen. Daher vermutete ich, dass der Ersatz von CTSS^{Y132} durch CTSS^{D132} die katalytische Triade generell näher an das Propeptid heranbringen und dadurch die autokatalytische Spaltung erleichtern könnte.

Um die strukturellen Auswirkungen der CTSS^{Y132D}-Mutation zu modellieren, wurden in Kooperation Molekulardynamiksimulationen (MD) unter sauren Bedingungen durchgeführt. Ausgehend von der veröffentlichten CTSS-Struktur wurden die Abstände zwischen den Molekülen nach Einführung der Mutation über einen festen Zeitraum berechnet. Eine zuvor beschriebene autokatalytische Spaltstelle zwischen CTSS^{S93-S94} führt zu einem Protein mittlerer Größe/Intermediat (Quraishi and Storer 2001). Zu frühen Zeitpunkten der MD-Simulationen (10,1 - 25 ns) lag das Nukleophil CTSS^{C139} bei CTSS^{D132} näher an CTSS^{S94} als bei CTSS^{Y132} (**Abbildung 9D** und **Anhang 1A**). Mit zunehmender Simulationszeit nahm der Abstand zwischen CTSS^{C139} und CTSS^{S94} jedoch wieder zu und war zu späteren Zeitpunkten (105 - 110,1 ns) für CTSS^{Y132} und CTSS^{D132} fast gleich. Im Gegensatz dazu nahmen die molekularen Abstände zwischen CTSS^{C139} und CTSS^{L80}, CTSS^{G81} und CTSS^{D82} bei CTSS^{D132} ab, während diese Abstände bei CTSS^{Y132} im Wesentlichen unverändert blieben (**Abbildung 9D** und **Anhang 1B-D**). Daraus schlossen wir, dass CTSS^{D132} durch den kürzeren Abstand zur Prodomäne die autokatalytische Umwandlung erhöhte.

Um das Modell experimentell zu überprüfen, habe ich CTSS-Proteine unterschiedlicher Größe aus einem SDS-PAGE-Gel aufgereinigt (**Abbildung 9E**) und Massenspektrometrie (LC-MS/MS) in Kollaboration durchgeführt. Zusätzlich zu pro-CTSS und aktivem CTSS konnte ich mit LC-MS/MS tatsächlich passende Peptide in der CTSS-Bande mittlerer Größe nachweisen (**Abbildung 9F**). Es konnten sowohl tryptische als auch semitryptische Peptidsequenzen identifiziert werden (**Anhang 2B**).

Die CTSS^{Y132D}-Mutation könnte allerdings auch als Phosphomimetikum fungieren. Tatsächlich sagen bioinformatische Algorithmen (z. B. NetPhos2.0) CTSS^{Y132} als eine Phosphorylierungsstelle von SRC-, EGFR- und INSR-Kinasen vorher. Meine massenspektrometrischen Analysen konnten jedoch mit zwei unterschiedlichen Methoden der Probenvorbereitung keine Peptide um die Stelle CTSS^{Y132} identifizieren (**Anhang 2A+B**).

Unsere Daten sind vereinbar mit dem Modell, dass die CTSS^{Y132D}-Mutation den Abstand der katalytischen Domäne zur Prodomäne von CTSS verringert und somit die

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

autokatalytische Umwandlung von pro-CTSS zu aktivem CTSS (über ein oder mehrere Intermediate) beschleunigt.

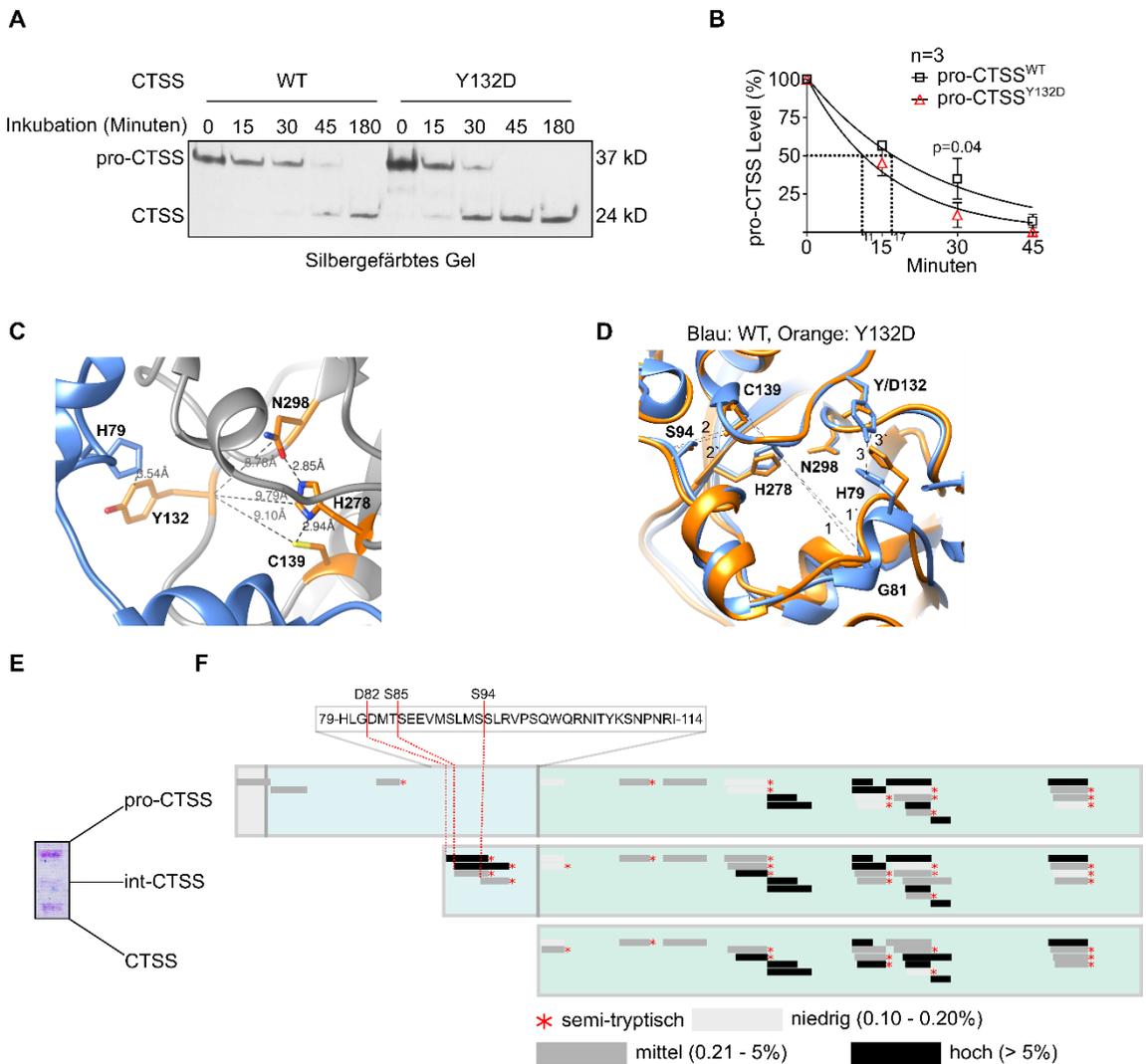


Abbildung 9 CTSS^{Y132D} beschleunigt die autokatalytische CTSS-Aktivierung.

A) *In vitro* autokatalytische Umwandlung von aufgereinigtem pro-CTSS zu CTSS (WT und Y132D) im Laufe der Zeit unter Endolysosom-ähnlichen Bedingungen (pH 5,5) auf einem silbergefärbten SDS-PAGE-Gel aufgetragen. **B)** Densitometrie der Bandenintensitäten von 3 unabhängigen Proteinumwandlungen aus (A). Die Halbwertszeit ist durch gepunktete Linien dargestellt. **C)** Veröffentlichte Kristallstruktur von menschlichem pro-CTSS (PDB: 2C0Y). Dargestellt sind die Konformation der katalytischen Triade (CTSS^{C139}, CTSS^{H278} und CTSS^{N298}) und die Abstände zu CTSS^{Y132}. Der Abstand zwischen ausgewählten Atomen von CTSS^{H79} und CTSS^{Y132} ist ebenfalls dargestellt. Die Pro-Sequenz ist in blau dargestellt. **D)** Schnappschuss der MD-Simulation bei 108,3 ns. Blau, pro-CTSS^{WT}; orange, pro-CTSS^{Y132D}. Abstände (gestrichelte Linien) zwischen den Molekülen sind mit Nummern markiert: 1 = 19,16 Å (CTSS^{WT}: CTSS^{C139}-CTSS^{G81}); 1' = 17,66 Å (CTSS^{Y132D}: CTSS^{C139}-CTSS^{G81}); 2 = 5,84 Å (CTSS^{WT}: CTSS^{C139}-CTSS^{S94}); 20 = 5,84 Å (CTSS^{Y132D}: CTSS^{C139}-CTSS^{S94}); 3 = 3,27 Å (CTSS^{WT}: CTSS^{Y132}-CTSS^{H79}); 30 = 2,87 Å (CTSS^{D132}-CTSS^{H79}). **E)** Coomassie-blau gefärbte SDS-PAGE mit den für die Massenspektrometrie verwendeten Proteinbanden. **F)** LC-MS/MS-Analyse von pro-, intermediären (int)- und CTSS. Rote Linien markieren mögliche autokatalytische Spaltstellen (CTSS^{D82}, CTSS^{S85} und CTSS^{S94}) innerhalb des Propeptids. Sternchen kennzeichnen semi-tryptische Peptide. Die Peptidhäufigkeiten sind in verschiedenen Grautönen dargestellt. Gepoolte

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Daten aus biologischen Replikaten (n) sind als Mittelwert \pm SD dargestellt; p-Werte sind aus dem ungepaarten Student's t-Test. Die ganze Abbildung wurde übernommen aus (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

4.2 Einfluss von CTSS^{Y132D} auf die CD74 Prozessierung *in vitro*

Um die Auswirkung der CTSS-Hyperaktivität in B-NHL Zellen zu untersuchen, habe ich die Substratschneideaktivität bekannter, physiologischer CTSS-Substrate im Lysosom untersucht, angefangen mit CD74. Tatsächlich konnte ich in Karpas422-Klonen mit CTSS^{Y132D}-Mutation (Klon #E2 und #H41) im Vergleich zu CTSS^{WT} Zellen geringere Level an CD74 in voller Länge (p34) und mehr gespaltenes CD74 im Western Blot nachweisen. Die Behandlung mit dem Cathepsin-Inhibitor E-64 verhinderte die CD74-Spaltung fast vollständig (**Abbildung 10**, links). Ähnliche Ergebnisse wurden bei DG75 CTSS^{KO}-Zellen beobachtet, die entweder CTSS^{WT} oder CTSS^{Y132D} überexprimierten (CTSS^{WT}_{hi}, CTSS^{Y132D}_{hi}) und wurden mit DG75 CTSS^{KO} Zellen verglichen, die nur den Kontrollvektor (EV) überexprimierten (**Abbildung 10**, rechts).

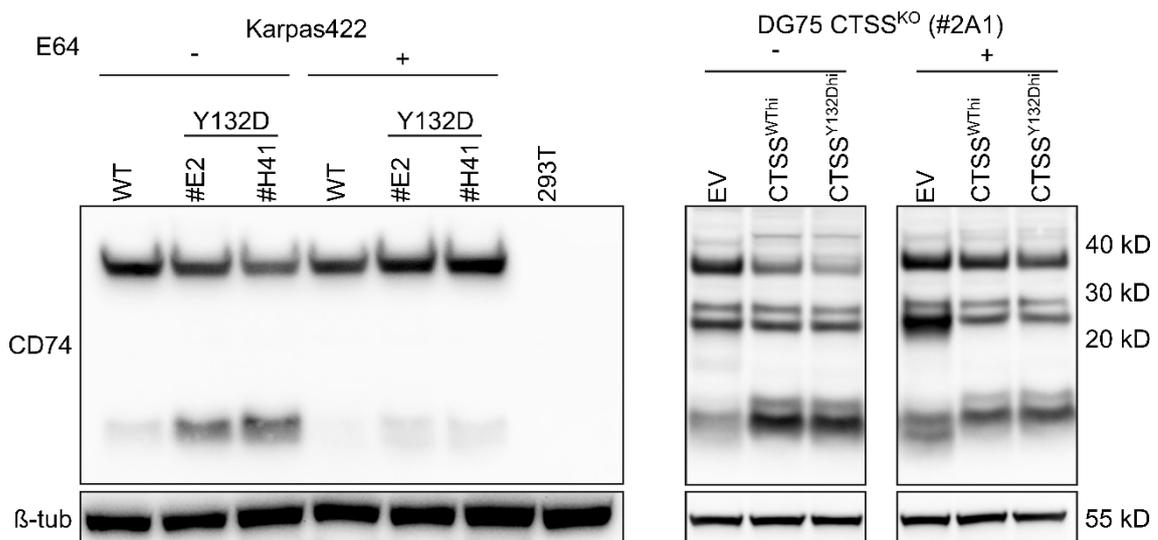


Abbildung 10 CTSS^{Y132D}-Mutation erhöht die CD74 Prozessierung *in vitro*.

Western Blot für CD74 in Karpas422 mit CTSS^{WT}_{hi} oder CTSS^{Y132D}_{hi} (#E2 und #H41) und DG75 CTSS^{KO} Zellen, die leeren Vektor (EV), CTSS^{WT}_{hi} oder CTSS^{Y132D}_{hi} exprimieren. E-64 wurde als Cathepsin-Inhibitor verwendet. 293T Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Das Experiment ist repräsentativ für 3 unabhängige Replikate für beide Zelllinien. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Dieses Ergebnis diente als Grundlage die Auswirkungen von CTSS^{Y132D} auf antigenspezifische CD4⁺ T Zellen *in vitro* zu untersuchen und wurde in Kollaboration mit Josef Mautner mit einem etablierten Co-Kultur-Assay durchgeführt (Fiebiger, Moosmann et al. 2012). Die Co-Kultur-Assays konnten zeigen, dass Lymphomzellen mit CTSS^{Y132D}_{hi}-Mutation oder Überexpression von CTSS^{WT}_{hi} zu einer verstärkten Aktivierung von

antigenspezifischen CD4⁺, aber nicht von CD8⁺ T Zellen führen, was mit IFN- γ -ELISA gemessen wurde (Bararia, Hildebrand et al. 2020). Darauf aufbauend habe ich die Auswirkungen von CTSS^{Y132D} in immunkompetenten Mäusen untersucht.

4.3 Die Auswirkungen der CTSS-Hyperaktivität auf das Tumorstadium in immunkompetenten Mäusen

Um die aberrante CTSS-Hyperaktivität funktionell mit dem Lymphomwachstum zu verknüpfen, habe ich in A20 B-NHL Zellen (stammend aus einem in BALB/c-Mäusen spontan entstandenem Retikulumzellneoplasma) (Kim et al., 1979), den leeren Kontrollvektor (EV), CTSS^{WThi} oder CTSS^{Y132Dhi} exprimiert (alle GFP-markiert) und bestätigte die GFP-Expression nach Sortierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie (**Abbildung 11A**).

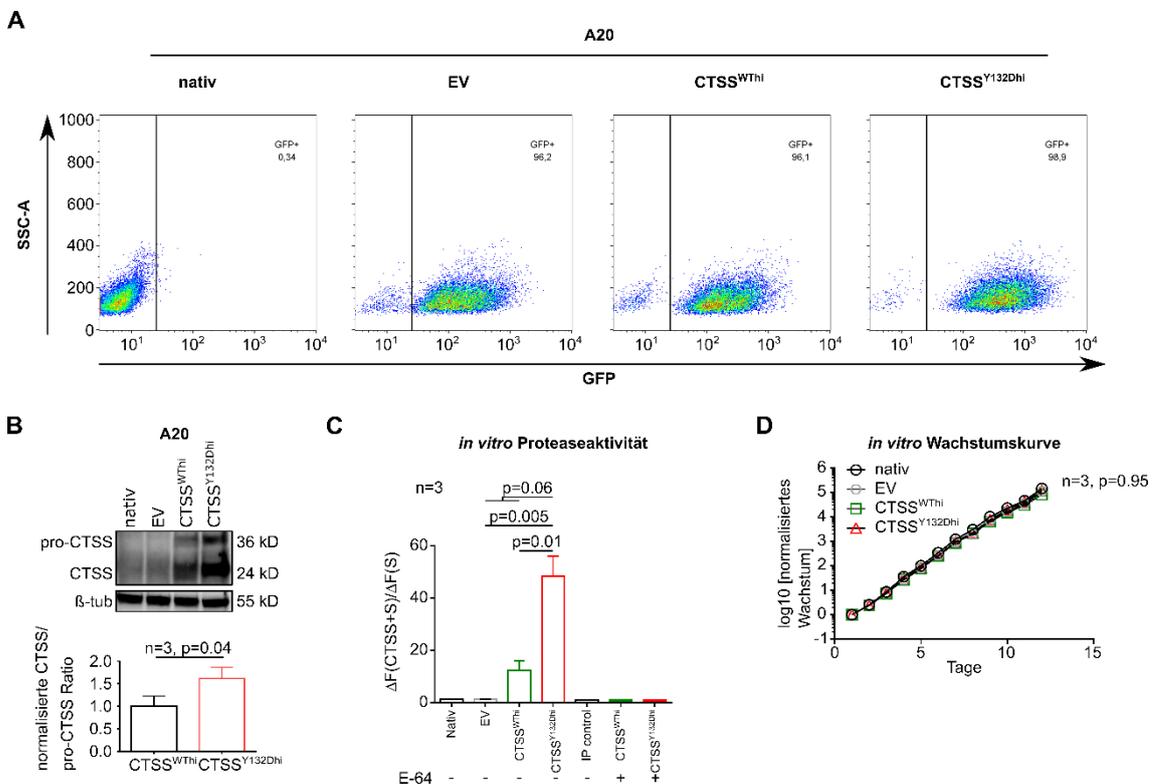


Abbildung 11 Transduktion und *in vitro* Experimente mit A20 Zellen.

A) Durchflusszytometrische Analyse nativer, Kontrollvektor (EV), CTSS^{WThi} und CTSS^{Y132Dhi} transduzierter A20 Zellen. **B)** Western Blot mit Quantifizierung unter Verwendung von 3 verschiedenen Lysaten von stabil transduzierten A20 Zellen; Mittelwert der Bandenintensität \pm SD. **C)** CTSS-Substratspaltungsaktivität nach 16 h. Z-VVR-AFC wurde als CTSS-Substrat verwendet; E-64 wurde als Cathepsin-Inhibitor verwendet. Die Substratspaltungsaktivität-Aktivität nach 16 Std von 3 unabhängigen IPs wurde zweimal gemessen; Mittelwert der Aktivität \pm SD. **D)** Normalisiertes log₁₀ *in vitro* Wachstum 3 unabhängiger Zellkulturflaschen mit stabil transduzierten A20 Zellen; Mittelwert des Wachstums \pm SD. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Western Blot und Densitometrie bestätigten eine erhöhte CTSS-Expression in A20 CTSS^{WThi} und ein erhöhtes Verhältnis von aktivem CTSS zu pro-CTSS in A20 CTSS^{Y132Dhi} (**Abbildung 11B**). Wie in **Abbildung 7** konnte ich auch in A20 Zellen eine signifikant erhöhte *in vitro*-Proteaseaktivität von immunopräzipitiertem CTSS^{Y132Dhi} feststellen und die Aktivität konnte durch den Cathepsin-Inhibitor E-64 vollständig gehemmt werden (**Abbildung 11C**). In der *in vitro*-Wachstumskinetik dieser Zellen konnte ich keine Unterschiede feststellen (**Abbildung 11D**).

Anschließend haben wir BALB/c-Mäuse mit SRBC geimpft und deren Milzzellen nach 10 Tagen isoliert und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Die Milzzellen wurden darauf mit den transduzierten A20-Lymphomzellen im Verhältnis von 1:5 gemischt (Übersicht in **Abbildung 12A**). Die stimulierten, syngenen Milzzellen dienten als Modell für eine GC-ähnliche Immunzellinfiltration. Durchflusszytometrie bestätigte das Mischungsverhältnis (**Abbildung 12B**). Die Mischungen wurden dann immunkompetenten BALB/c-Empfängern injiziert, und anschließend wurde das Tumorstadium verfolgt. Anders als *in vitro* führte die CTSS-Hyperaktivität in A20 Zellen (CTSS^{WThi} und CTSS^{Y132Dhi}) im Vergleich zu EV-Kontrollen zu einem beschleunigten Tumorstadium *in vivo*. Dies konnte in zwei separaten Experimenten mit unterschiedlichen Startzellzahlen bestätigt werden (1.2×10^6 Zellen **Abbildung 12C** und 1.2×10^5 Zellen in **Abbildung 12D**).

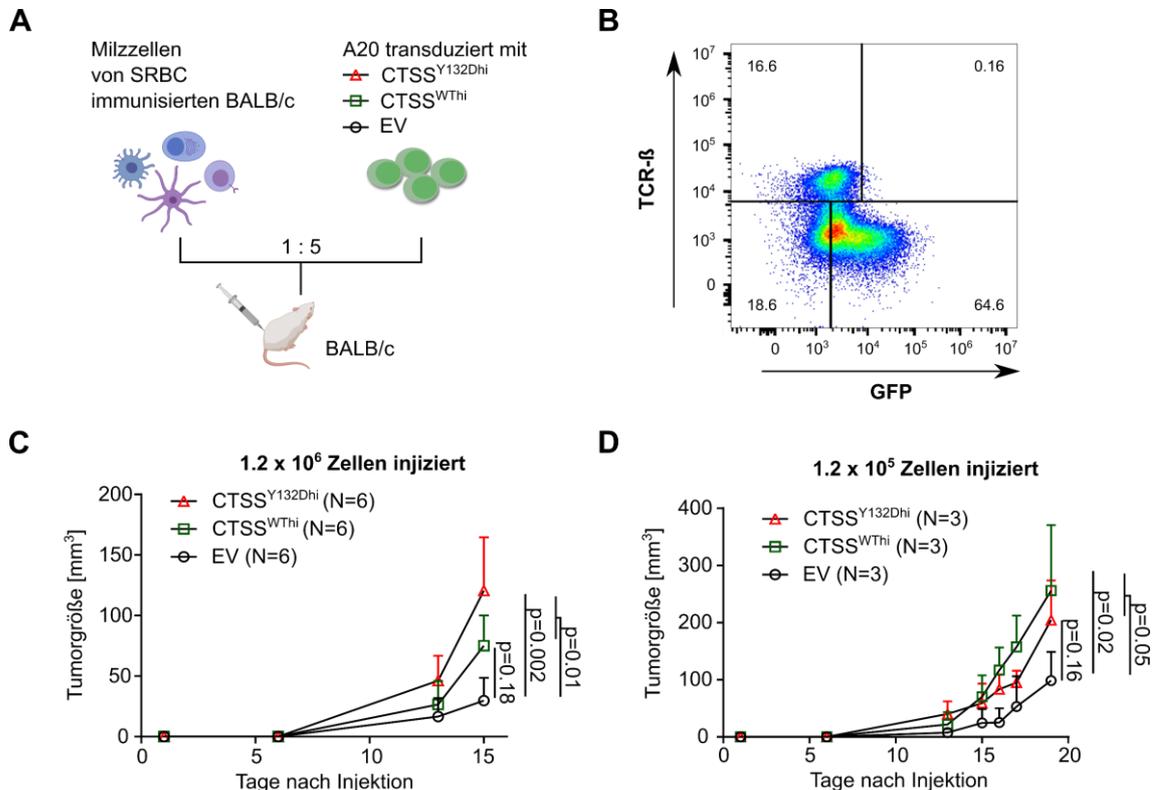


Abbildung 12 CTSS Hyperaktivität beschleunigt das Tumorstadium in immunkompetenten Mäusen.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

A) Experimenteller Überblick. Milzzellen ($0,2 \times 10^6$) von mit roten Blutkörperchen (SRBC) immunisierten BALB/c-Mäusen wurden 1 zu 5 mit stabil transduzierten A20 Zellen (1×10^6) gemischt. Insgesamt wurden dann $1,2 \times 10^6$ Zellen pro BALB/c-Maus injiziert. N = 6 Mäuse pro Gruppe (CTSS^{WThi} versus CTSS^{Y132Dhi} versus EV). **B)** Durchflusszytometrie einer Vorinjektionsmischung bestehend aus Milzzellen und transduzierten A20 Zellen im Verhältnis 1:5. **C)** Tumorwachstum und Tumolvolumen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Injektion von $1,2 \times 10^6$ Zellen gemessen. p-Werte sind für Tag 16 angegeben; Tumorgöße ist als Mittelwert \pm SEM dargestellt. **D)** Ähnlich wie in (C) mit $1,2 \times 10^5$ injizierten Zellen. Mausexperimente in Kollaboration mit der AG Weinstock. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

4.4 Die Auswirkungen der CTSS-Hyperaktivität auf die CD4⁺ T Zell-Infiltration und Immunaktivierung

Wir beendeten das Experiment am Tag 19 und isolierten die Tumore aus **Abbildung 12D** zur genaueren Untersuchung mit immunhistochemischen (IHC) Färbungen und Durchflusszytometrie. IHC-Färbungen zeigten in CTSS^{WThi}- und CTSS^{Y132Dhi}-Tumoren im Vergleich zu den EV-Kontrollen eine signifikant höhere CD4⁺ T Zell-Infiltration auf (**Abbildung 13A+B**), während die CD8⁺ T Zell-Infiltration im Allgemeinen gering war (**Abbildung 13A+B**). Entsprechend zeigten CTSS^{Y132Dhi}-Tumoren höhere CD4⁺/CD8⁺-T Zell-Verhältnisse, sowohl in Auswertungen der IHC Färbungen (**Abbildung 13C**) als auch in der Durchflusszytometrie (**Abbildung 13D**), und signifikant erhöhte IFN- γ -Spiegel (**Abbildung 13E**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CTSS-Hyperaktivität in diesem FL Modell das Tumorwachstum fördert und ein verändertes TME induziert, das durch eine vermehrte CD4⁺ T Zell Infiltration und erhöhte IFN- γ -Spiegel gekennzeichnet ist.

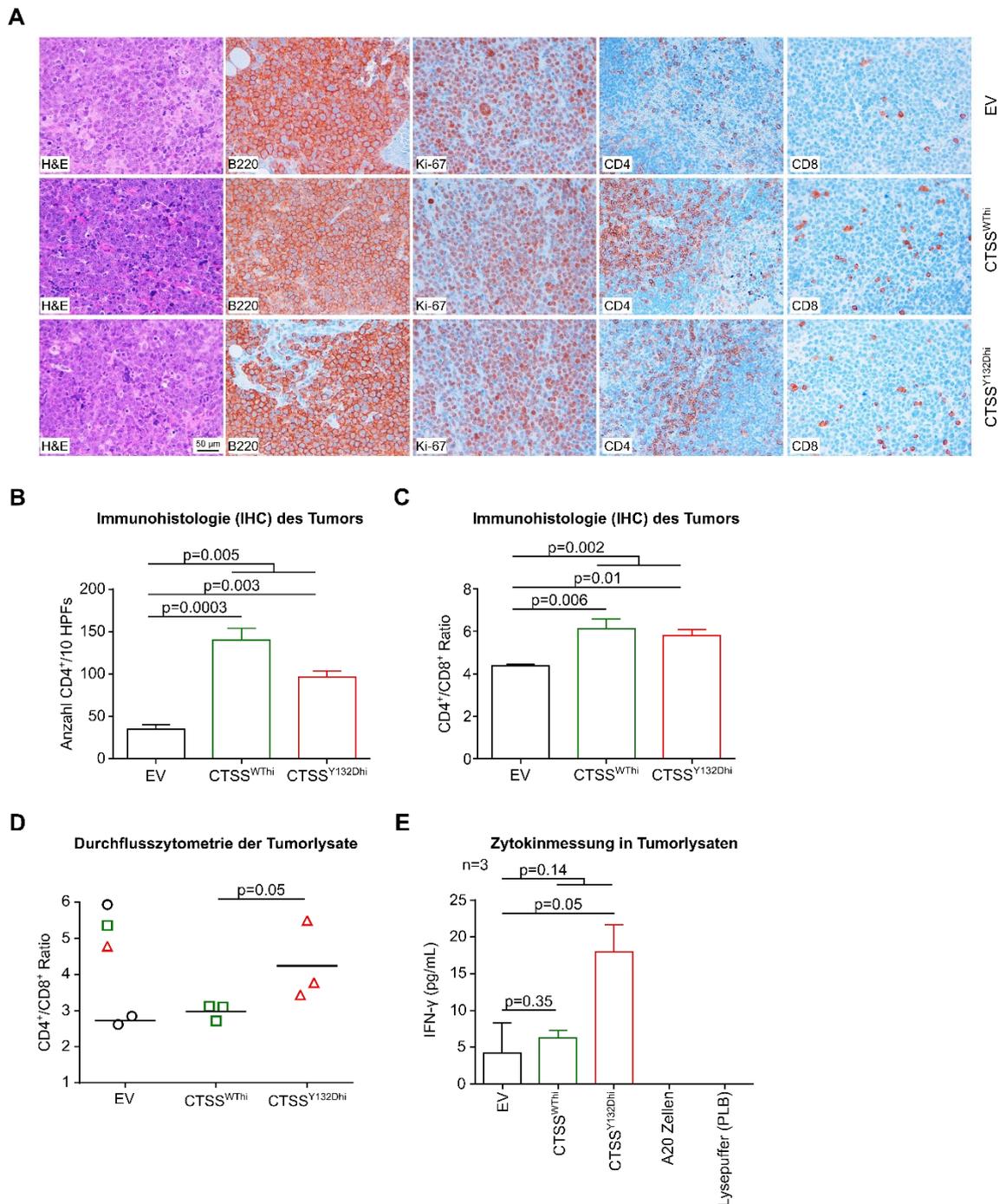


Abbildung 13 Hyperaktive CTSS-Maustumore zeigen eine erhöhte CD4⁺ T Zell-Infiltration und Immunaktivierung.

A) Immunhistochemie (IHC) von isolierten, Formalin-fixierten Mäusetumoren für H&E, B220, Ki-67, CD4 und CD8; Maßstab ist 50 μ m. **B)** Anzahl der CD4⁺ T Zellen in 10 High-Power-Fields (HPFs) aus (Abbildung 12C) unter Verwendung von 2 (EV) oder 3 (CTSS^{WThi} und CTSS^{Y132Dhi}) verfügbaren Mäusetumoren; Mittelwert \pm SD. **C)** Verhältnis von CD4⁺ T Zellen zu CD8⁺ T Zellen aus den HPF-Zählungen aus (B) und **D)** aus der Durchflusszytometrie der Tumorslysate; Mittelwert \pm SD. **E)** IFN- γ -Messung in Tumoren, die mit passivem Lysepuffer (PLB) lysiert wurden (n = 3). A20 Zellen und PLB wurden als Negativkontrollen verwendet. E-64 wurde als Cathepsin Inhibitor verwendet; Mittelwert \pm SD. Alle p-Werte resultieren aus dem ungepaarten Student's t-Test. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

4.5 Integrierte Analyse von CTSS-Mutationen, Amplifikationen und Genexpression beim FL

Als nächstes wollte ich herausfinden, ob die CTSS-Hyperaktivität auch in humanen FL – wie im Mausmodell – mit einer aktivierten immunologischen Mikroumgebung zusammenhängt. Dazu haben wir zunächst versucht, ob wir FL mit erhöhter CTSS-Expression identifizieren können.

Für 146 diagnostische Biopsien von Patienten der GLSG2000 Kohorte mit fortgeschrittenem FL konnten wir CNA mittels OncoScan ermitteln (CGAT). Darüber hinaus haben wir den CTSS-Amplifikationsstatus von weiteren 140 FL aus der BCCA mit Hilfe von DNA-Sequenzierungsdaten und einer bioinformatischen Pipeline (CNVkit) abgeleitet. Insgesamt waren damit Daten von 286 FL für die Analyse des CTSS-Mutations- und Amplifikationsstatus verfügbar und die beiden Methoden gut vergleichbar ($R=0,91$, $p=2,2e^{-16}$) (**Abbildung 14A**). Von den 286 Fällen wiesen 49 Fälle (17%) eine CTSS^{Y132}-Mutation oder CTSS-Amplifikationen auf (**Abbildung 14B**). Es gab keine Fälle mit gleichzeitigem Vorliegen von CTSS-Mutation und CN gain (**Abbildung 14B**). Daraus kann man die Hypothese ableiten, dass beide Alterationen einen biologisch redundanten Phänotyp haben. Wir analysierten insgesamt 51 diagnostische FL-Biopsien mit verfügbarem CTSS-Kopienzahlstatus (CN) und CTSS-Genexpressionsdaten und bestätigten, dass FLs mit CTSS-Amplifikationen auch erhöhter CTSS-Expression aufweisen (**Abbildung 14C**). Mit Hilfe des *k-means* Algorithmus identifizierten wir 11 Fälle mit hoher CTSS-Expression (22%), darunter 8 Fälle mit CTSS CN neutral.

Als nächstes analysierte ich öffentlich zugängliche Transkriptomdaten von B Zellen aus 5 gesunden Keimzentren (Zentroblasten, CBs, und Zentrozyten, CCs), 4 gesunden Blutproben (B Zellen aus peripherem Blut, pBBCs) und 16 FL-Biopsien (FLs) (Koues, Kowalewski et al. 2015). Durch *k-means*-Clustering identifizierte ich eine Untergruppe von FLs (11/16), die im Vergleich zu normalen CBs und CCs, dem normalen Gegenstück (d. h. den gesunden Ursprungszellen) von FL, signifikant höhere CTSS-Expressionswerte aufwies (**Abbildung 14D**).

Daraus leiteten wir ab, dass CTSS-Hyperaktivität in FL-Zellen sowohl mit Hilfe von CTSS^{Y132}-Mutationen und der daraus resultierenden, beschleunigten, autokatalytischen Umwandlung von pro-CTSS in aktives CTSS, als auch mit Hilfe der CTSS Überexpression auf Grund von CN-Zuwachs oder transkriptioneller Dysregulation, entstehen kann.

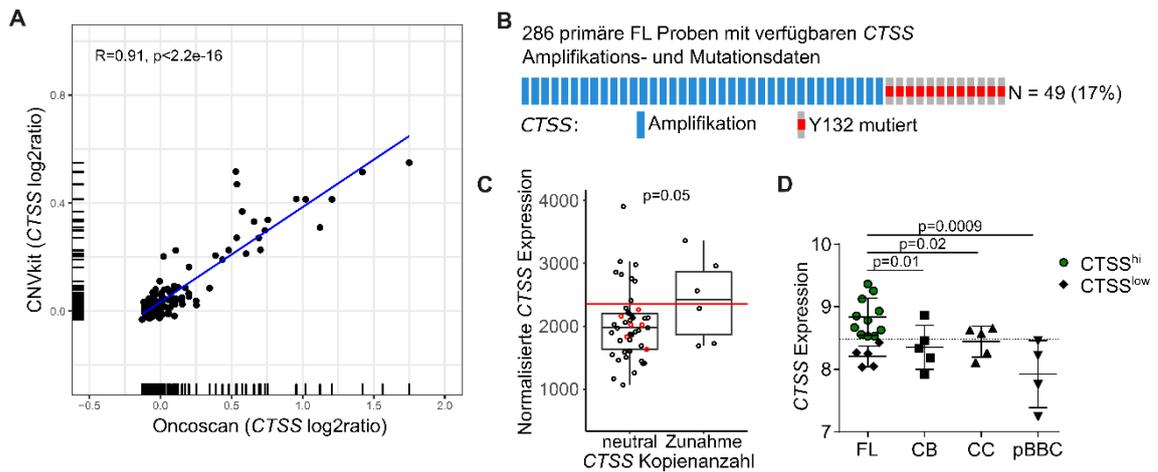


Abbildung 14 CTSS-Hyperaktivität in primären Patientenproben aus der GLSG2000-Kohorte.

A) Analyse der Kopienzahl (CN) aus DNA-Sequenzierungsdaten. Aufgetragen sind die CTSS log₂-Werte, die mit der CNVkit-Pipeline analysiert wurden, gegen die CTSS log₂-Werte die mit OncoScan (CGAT) für eine Teilmenge unserer Studienkohorte (N=146) gewonnen wurden. Dargestellt sind Pearsons r und p-Wert. **B)** Vergleich primärer FL-Proben mit Zunahme der CTSS-Kopien (blau) und CTSS^{Y132}-Mutationen (rot) aus unserer Kohorte (N = 286). **C)** Normalisierte CTSS-Genexpression unterteilt nach CTSS-CN-Status (neutral vs. Zunahme). Proben mit hoher CTSS-Expression (oberhalb der roten Linie) wurden mit dem k-means Algorithmus identifiziert. FL mit CTSS^{Y132}-Mutationen sind durch rote Kreise gekennzeichnet; p-Wert aus ungepaarten Student's t-Test. **D)** Normalisierte CTSS-Expression aus Transkriptomdaten maligner und nicht maligner B Zellen (CB, Zentroblasten; CC, Zentrozyten; pBBCs, B Zellen aus dem peripheren Blut). FL-Proben mit hoher CTSS-Expression wurden mittels k-means Clustering identifiziert (grüne Punkte über der gestrichelten Linie); p-Werte aus ungepaarten Student's t-Test. Die Daten von Abbildung A, B und C wurden von Dr. Verena Passerini ausgewertet und geplottet. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Schließlich konnten wir CD4 und CD8 in 15 primären FL-Biopsien mittels IHC untersuchen (**Abbildung 15A**). FL mit hoher CTSS-Expression (CTSS^{hi}) und FL mit CTSS Y132D-Mutationen (CTSS^{Y132D}) wiesen eine höhere intrafollikuläre CD4⁺ T Zell-Infiltration auf als FL ohne CTSS^{Y132D}-Mutationen und niedriger CTSS-Expression (CTSS^{WT+low}). Weiterhin korrelierte die intrafollikuläre CD4⁺ T Zell-Häufigkeit mit der CD4-Genexpression (**Abbildung 15B**), sowie die CTSS-Genexpression mit der CD4-Genexpression (**Abbildung 15C**). FL mit hyperaktivem CTSS (CTSS^{hi} und/oder CTSS^{Y132D}) wiesen – wie in vorherigen Experimenten (**Abbildung 13C+D**) – ein höheres CD4/CD8-Verhältnis auf, das bei FL mit CTSS^{Y132D} am stärksten ausgeprägt war (**Abbildung 15D**).

Damit konnte wir bestätigen, dass CTSS-Hyperaktivität das TME auch in humanem FL beeinflusst.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

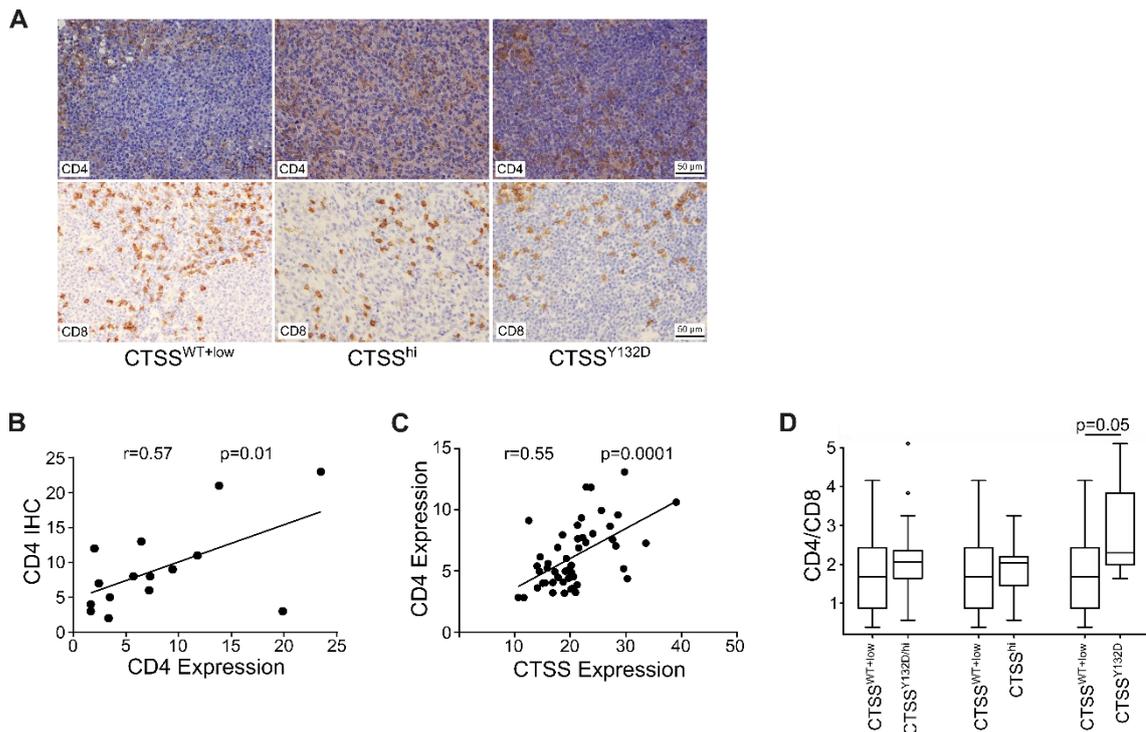


Abbildung 15 CTSS-Hyperaktivität steht in Verbindung mit vermehrter CD4⁺ T Zell Infiltraten in diagnostischen FL-Biopsien.

A) Repräsentative IHC-Färbungen für CD4 und CD8 in diagnostischen FL-Biopsien. Siehe **Abbildung S6C** aus (Bararia, Hildebrand et al. 2020) für CD4/CD8-Verhältnisse auf der Grundlage von IHC-Zählungen; Maßstabsbalken sind 50 μ m. **B)** Die Anzahl der CD4⁺ T Zellen pro 100 Zellen innerhalb eines FL-Follikels (durch IHC) wurde mit der CD4-Genexpression (normalisiert für den CCF) in 15 primären FL korreliert. **C)** Korrelation von CTSS und CD4-Genexpression. **D)** CD4/CD8-Verhältnisse von CTSS^{WT+low} FL gegenüber CTSS^{Y132D/hi}, CTSS^{hi} oder CTSS^{Y132D} FL; p-Wert ist aus dem ungepaarten Student's t-Test. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

4.6 Einfluss der CTSS-Hyperaktivität auf die Behandlungsergebnisse bei Patienten, die eine Immunchemotherapie erhalten

Mein nächstes Ziel war es, herauszufinden, ob die CTSS-Hyperaktivität auch mit dem Behandlungsergebnis bei FL verbunden ist. Wir analysierten zuerst nur Patienten aus den zuvor berichteten Kohorten der GLSG2000-Studie und des BCCA-Registers mit bekanntem CTSS-Mutations- und Genexpressionsstatus, die einheitlich eine Standard-Immunchemotherapie R-CHOP oder R-CVP als Erstlinientherapie für ein symptomatisches, fortgeschrittenes FL erhalten hatten (Pastore, Jurinovic et al. 2015). FL mit CTSS^{Y132}-Mutationen (N=6) oder CTSS-Überexpression (über *k-means*-Clustering, N=11) wurden in einer Kohorte (CTSS^{Y132D/hi}, N=17) zusammengefasst und mit FL ohne CTSS^{Y132}-Mutationen und niedriger CTSS-Expression (CTSS^{WT+low}, N=34) verglichen. Tatsächlich traten bei nur 6% der Patienten mit CTSS^{Y132D/hi} FL ein prognostisch

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

ungünstiger früher Progress der Erkrankung auf (progression of disease within 24 months (POD24)), im Vergleich zu 46% der Patienten mit $CTSS^{WT+low}$ FL (**Abbildung 16A**, $p=0,016$). Dies führte bei Patienten mit $CTSS^{Y132D/hi}$ FL zu einem längeren FFS (**Abbildung 16B**) und OS nach R-CHOP (**Abbildung 16C**).

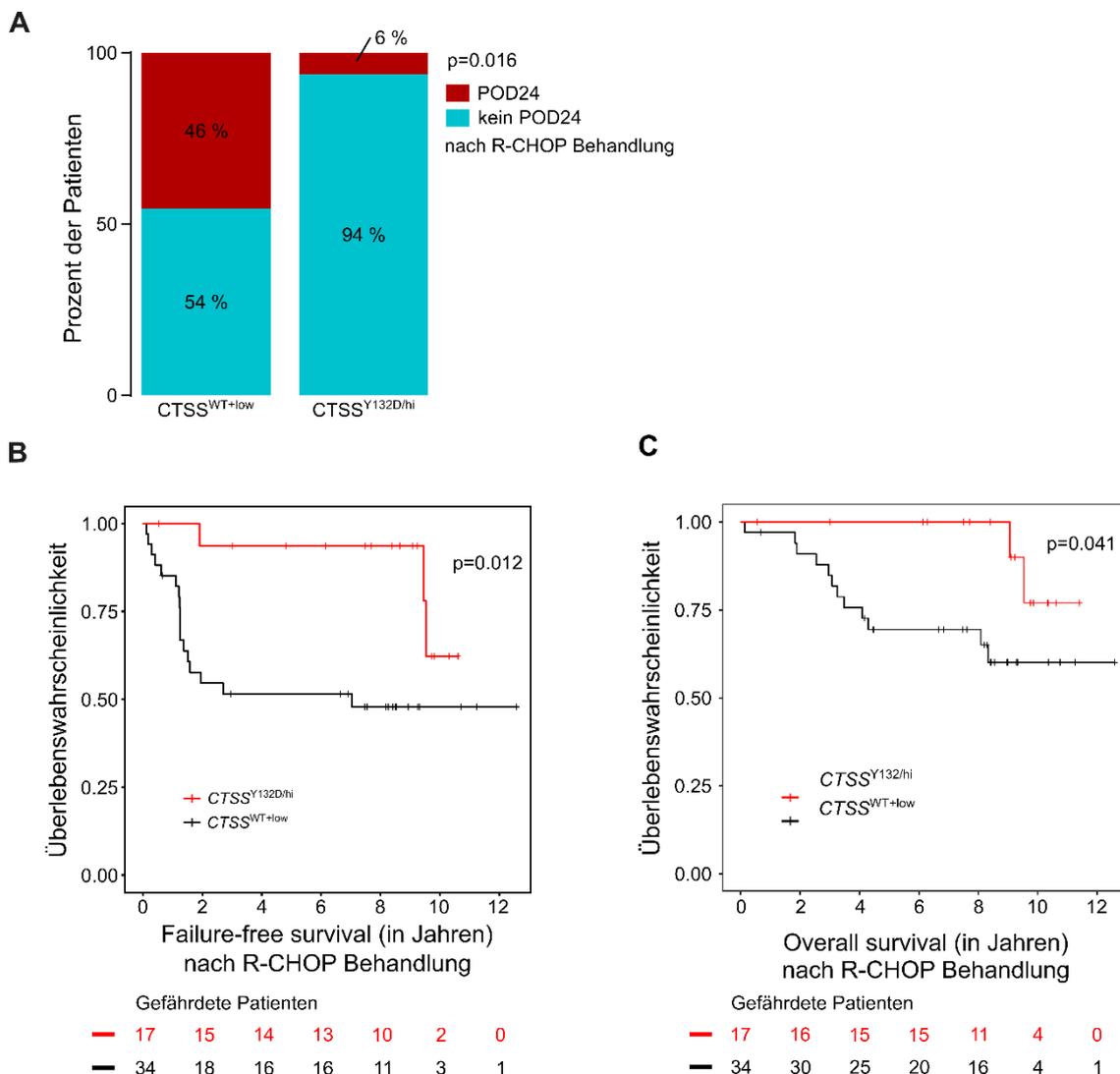


Abbildung 16 Der $CTSS$ -Mutations- und Expressionsstatus hat klinische Auswirkungen auf Patienten, die eine Standard-Immunchemotherapie erhalten.

A) Fortschreiten der Erkrankung innerhalb von 24 Monaten (POD24) bei R-CHOP-behandelten Patienten mit $CTSS^{WT+low}$ FL (N = 33) gegenüber $CTSS^{Y132D/hi}$ FL (N = 16). **B)** Kaplan-Meier-Diagramm für längeres, ereignisfreies Überleben (failure free survival, FFS) von mit R-CHOP behandelten Patienten mit $CTSS^{Y132D}$ FL (N = 6) plus $CTSS^{hi}$ FL (N = 11) gegenüber $CTSS^{WT+low}$ (N = 34); Der p-Wert stammt aus dem Log-Rank-Test. **C)** Kaplan-Meier-Diagramm für das Gesamtüberleben (overall survival, OS) von Patienten mit $CTSS^{Y132D/hi}$ FL (N=17) gegenüber $CTSS^{WT+low}$ (N=34); p-Wert aus Log-Rank-Test. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Schließlich wollte ich die Ergebnisse in einer unabhängigen Patientenkohorte validieren. Ich analysierte dazu erneut Sequenzierdaten von 174 Patienten mit FL aus einer zuvor publizierten real-life Kohorte (Tobin, Keane et al. 2019) und konnte $CTSS$ -Mutationen in

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

6 Fällen finden (3,4%, 5 x $CTSS^{Y132D}$, 1 x $CTSS^{M185V}$; **Abbildung 17A**). Von 104 der 174 Fälle erhielt ich RNA, die ich mittels digital multiplex gene expression profiling (Nano-String) analysiert habe. 30 Fälle wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen, da diese Patienten innerhalb eines Jahres nach der Diagnose keine systemische Behandlung bekamen („watch&wait“). Bei keinem dieser 30 Patienten waren $CTSS$ -Mutationen nachweisbar. Mittels *k-means*-Clustering klassifizierte ich 37 Fälle als $CTSS^{hi}$ (50%). Auch hier korrelierten die $CTSS$ -Expressionswerte signifikant mit der $CD4$ -Expression ($p=0.0026$) (**Abbildung 17B**).

Für die Analyse des Behandlungsergebnisses analysierten wir wiederum nur Patienten, die eine Standard-Immunchemotherapie erhielten (R-CHOP oder R-CVP oder R-Bendamustin, $N=72$). Ich konnte unseren früheren Befund bestätigen, dass Patienten mit $CTSS^{Y132D/hi}$ FL im Vergleich zu Patienten mit $CTSS^{WT+low}$ FL eine niedrigere POD24-Rate aufwiesen (9% vs. 29%, $p=0,057$) (**Abbildung 17C**). Außerdem beobachteten wir bei Patienten mit $CTSS^{Y132D/hi}$ FL einen Trend zu einem längeren FFS (**Abbildung 17D**).

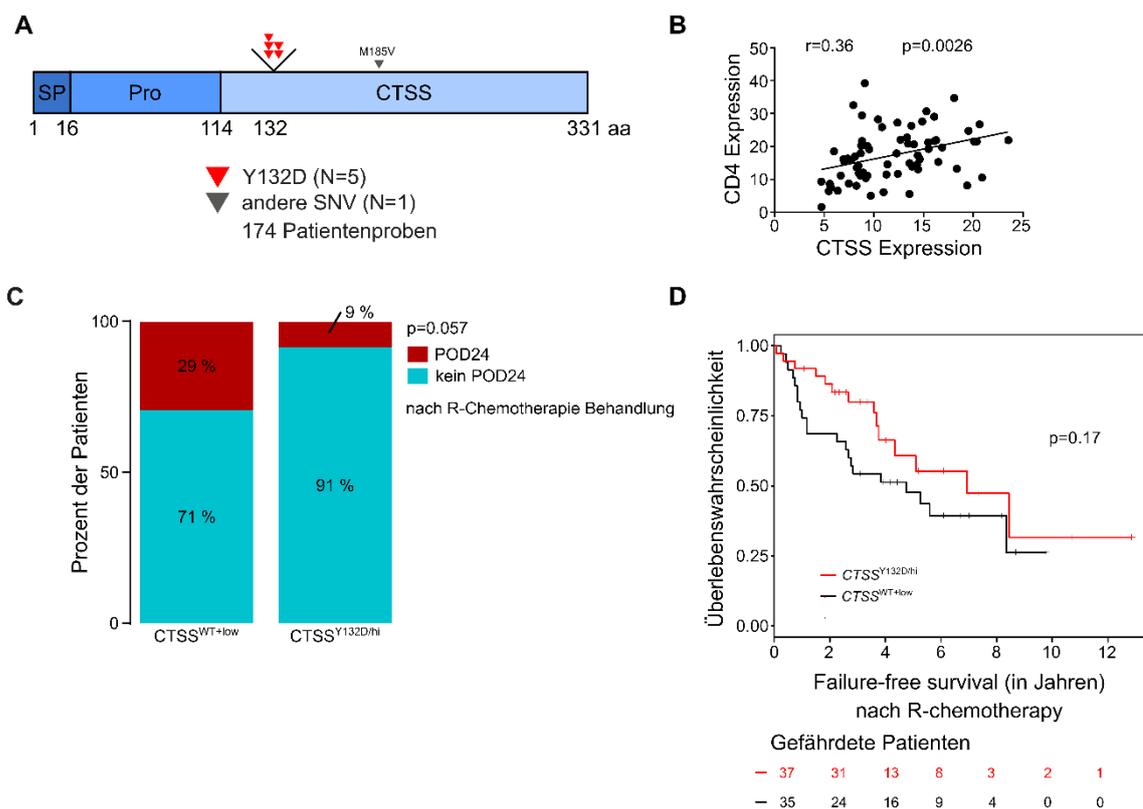


Abbildung 17 $CTSS$ -Hyperaktivität in einer unabhängigen Validierungskohorte.

A) Verteilung und Häufigkeit von $CTSS$ -Mutationen in 174 primären FLs aus einer zuvor beschriebenen Kohorte (Tobin, Keane et al. 2019). **B)** Korrelation der $CTSS$ - mit der $CD4$ -Expression. **C)** POD24-Status von mit R-Chemotherapie (CHOP, CVP oder Bendamustin) behandelten Patienten mit $CTSS^{WT+low}$ FL ($N = 56$) gegenüber $CTSS^{Y132D/hi}$ FL ($N = 13$); p -Wert ist aus dem ungepaarten Student's t-Test. **D)** Kaplan-Meier-Diagramm für das FFS von Patienten mit $CTSS^{Y132D/hi}$ FL ($N = 37$) im Vergleich zu $CTSS^{WT+low}$ FL ($N = 35$); p -Wert ist aus dem Log-Rank-Test. Die Abbildung erscheint ähnlich in (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Somit bestimmen die CTSS^{Y132D}-Mutation und die CTSS-Expression das Ansprechen auf Standardimmunchemotherapie bei Patienten mit FL, besonders während der ersten 24 Monate nach Behandlungsbeginn. Dennoch bleibt die Frage offen, was die Ursachen dafür sind.

4.7 Untersuchung weiterer tumorfördernder Signalwege in CTSS-hyperaktiven Lymphomzellen

Um den molekularen Mechanismus der CTSS-vermittelten Tumorprogression *in vivo*, sowie besserem Therapieansprechen bei FL genauer zu untersuchen, habe ich das CTSS-Interaktom in Lymphomzellen mit Co-Immunpräzipitation und anschließender quantitativer Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht.

4.7.1 Bestimmung gebundener Interaktionspartner von CTSS unter Verwendung von Co-immunopräzipitation (Co-IP) in Kombination mit Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Karpas422 Zellen mit und ohne CTSS-Hyperaktivität wurden mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) und anschließende quantitative Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht.

Zuerst bestätigten die Daten, dass CTSS in zwei CTSS^{WT} Einzelzellklonen in großer Menge im Vergleich zu zwei CTSS^{KO} Einzelzellklonen immunopräzipitiert wurde (**Abbildung 18A**). Zusätzlich konnte ich vier nukleäre Proteine NUD21 (Cleavage and polyadenylation factor subunit 5), RNGTT (mRNA capping enzyme), SNW1 (SNW domain-containing protein 1) und CSTB (Stefin B), sowie RPL29 (60S ribosomalen Protein L29) co-immunopräzipitieren (**Abbildung 18A**).

Von den fünf co-immunopräzipitierten Proteinen konnte bisher nur CSTB, als zytosolischer Cathepsin Inhibitor, mit CTSS in Verbindung gebracht werden (Haves-Zburof, Paperna et al. 2011) und wurde daher für weitere Analysen priorisiert.

Zunächst bestätigte ich mittels Co-IP gefolgt von LC-MS/MS in zwei CTSS^{Y132D} Einzelzellklonen, dass auch CTSS^{Y132D} CSTB binden kann (**Abbildung 18B**). Co-IP gefolgt von Western Blot bestätigte die Interaktion von CTSS mit CSTB (**Abbildung 18C**). Die einzige Überschneidung zwischen den CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} Co-IPs war CSTB. Erhöhte Mengen an aktivem CTSS in CTSS^{Y132D}-Klonen führten nach Co-IP auch zu erhöhten Mengen an CSTB. Daraus lässt sich schließen, dass CSTB in Zelllysaten im Überschuss vorhanden ist, und die Menge an aktivem CTSS die Menge an co-immunopräzipitiertem CSTB bestimmt.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

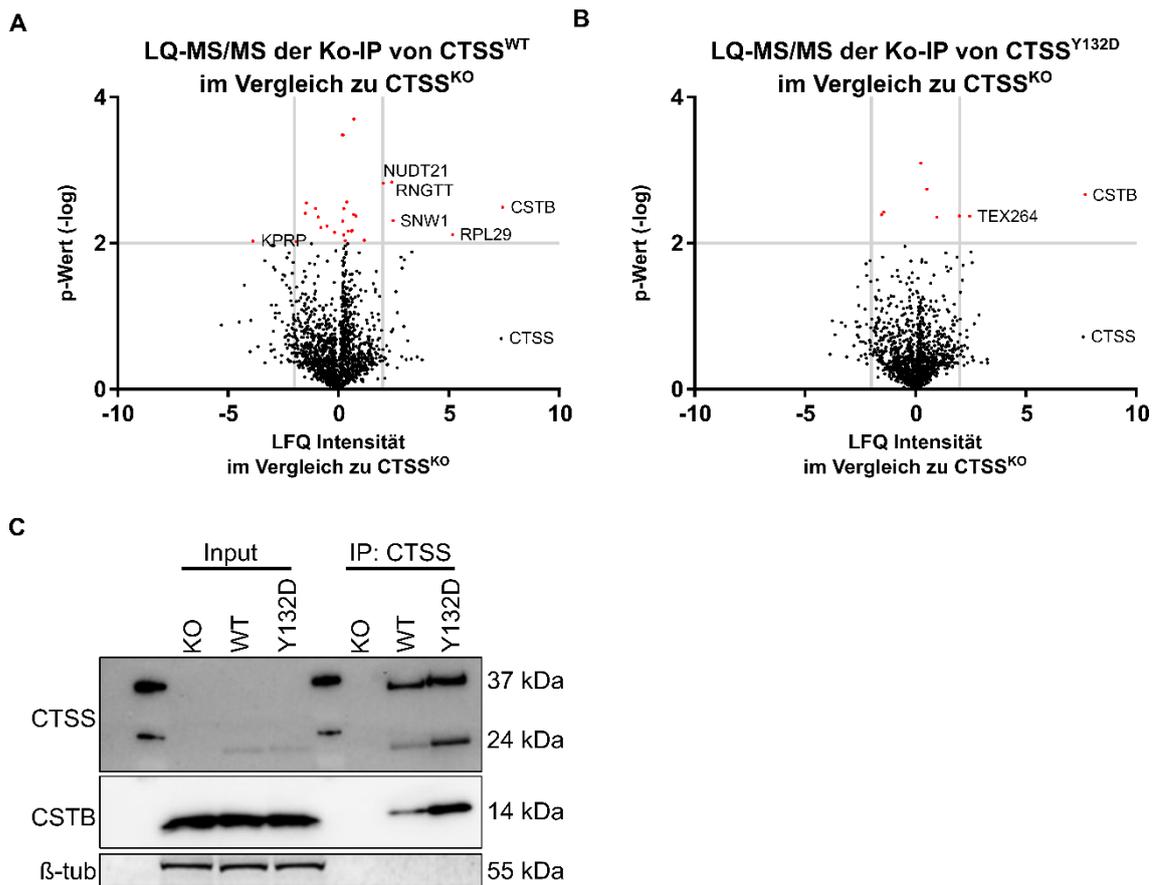


Abbildung 18 CTSS-Co-IP gefolgt von LC-MS/MS.

A) Identifizierte co-immunopräzipitierte Proteine in Karpas422-CTSS^{WT} Zellen, im Vergleich zu CTSS^{KO}-Kontrolle. Identifizierte Proteine mit einem $-\log$ -Wert ≥ 2 sind rot dargestellt. Es wurden nur Proteine mit einem $-\log$ -Wert ≥ 2 und einer LFQ Intensität ≥ 2 gelabelt. **B)** Wie in (A) unter Verwendung von CTSS^{Y132D} Zellen. **C)** Western Blot der CTSS-Co-IP.

4.8 Einfluss der Stefin B Expression auf die CTSS-Aktivität in FL

4.8.1 Einfluss von CSTB Knockdown auf die Substratspaltungsaktivität von CTSS in Zelllysaten

Um den Einfluss von CSTB auf die Substratspaltungsaktivität von CTSS zu untersuchen, führte ich einen lentiviralen shRNA-vermittelten Knock-down (k/d) von CSTB (sh_CSTB) in den zuvor benutzten Zelllinien (DG75 und Karpas422) durch. Eine Western Blot Analyse bestätigte die starke Abnahme von CSTB (**Abbildung 19A**). Außerdem bestätigte ich die Interaktion von CTSS mit CSTB mittels Co-IP in Zellen, die lentiviral mit einer Kontroll-shRNA (sh_scrambled) transduziert wurden (**Abbildung 19B, links**). Diese Interaktion war nach k/d von CSTB nicht mehr nachweisbar (**Abbildung 19B, rechts**).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

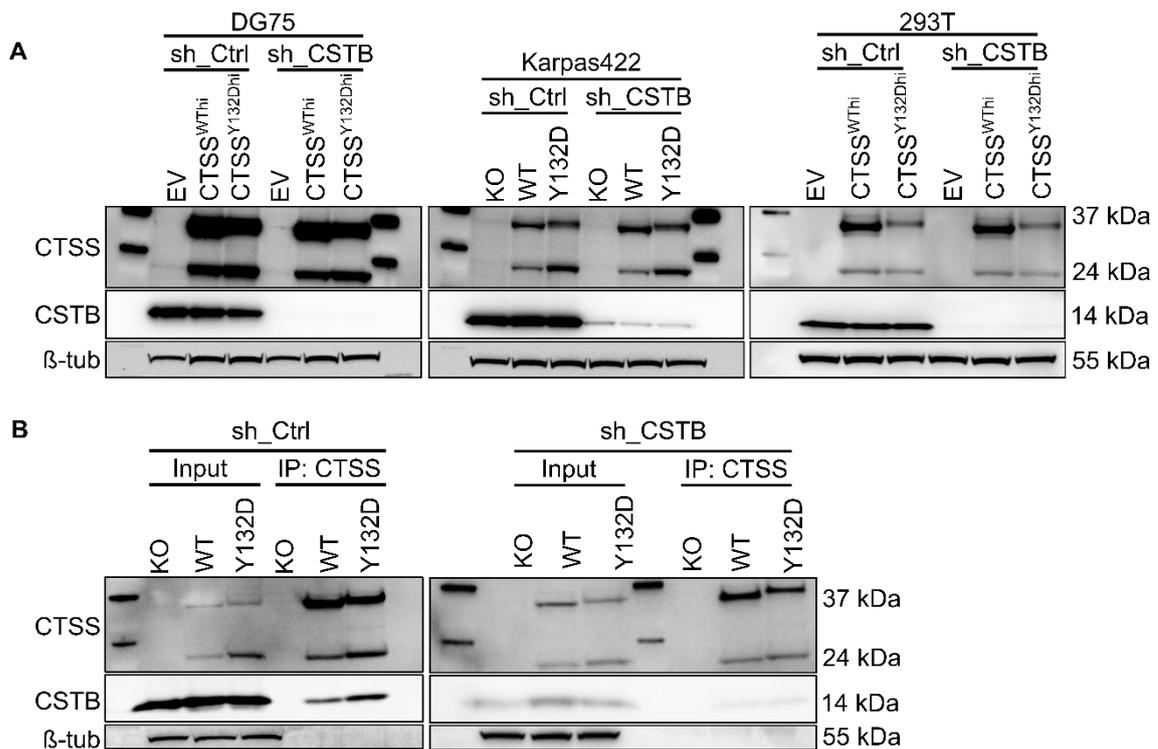


Abbildung 19 Stefin B bindet CTSS.

A) Western Blot des shRNA vermittelten Stefin B k/d in DG75, Karpas422 und 293T Zellen. EV = Leerer Kontrollvektor. **B)** Western Blot der CTSS-Co-IP in Karpas422. Sh_ctrl = nicht zielgerichtete shRNA; sh_CSTB = shRNA gegen CSTB.

Um zu testen, ob der CSTB k/d die Substratspaltungsaktivität von CTSS beeinflusst, haben wir zunächst die Netto-Cathepsinaktivität in 293T Zelllysaten mit und ohne CSTB-k/d sowie mit und ohne CTSS-Hyperaktivität (durch lentivirale CTSS^{WT}- oder CTSS^{Y132D}-Überexpression und EV-Kontrolle) gemessen. Insgesamt konnte ich zeigen, dass der k/d von CSTB die Netto-Cathepsin-Aktivität erhöhte und das Ausmaß in Zellen mit CTSS-Hyperaktivität gesteigert wurde (**Abbildung 20A**). Im nächsten Schritt verwendete ich die B-NHL Zelllinien (Karpas422 und DG75) und führte denselben Test zur Substratspaltungsaktivität durch. Auch in diesen Zelllinien bestätigte sich die erhöhte Cathepsin-Aktivität (**Abbildung 20B** für DG75 und **Abbildung 20C** für Karpas422). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CSTB ein endogener Cathepsin Inhibitor ist, der die CTSS-Aktivität in 293T und B-NHL Zelllinien hemmt. Ein CSTB k/d erhöht die Netto-CTSS-Aktivität in allen Modellen.

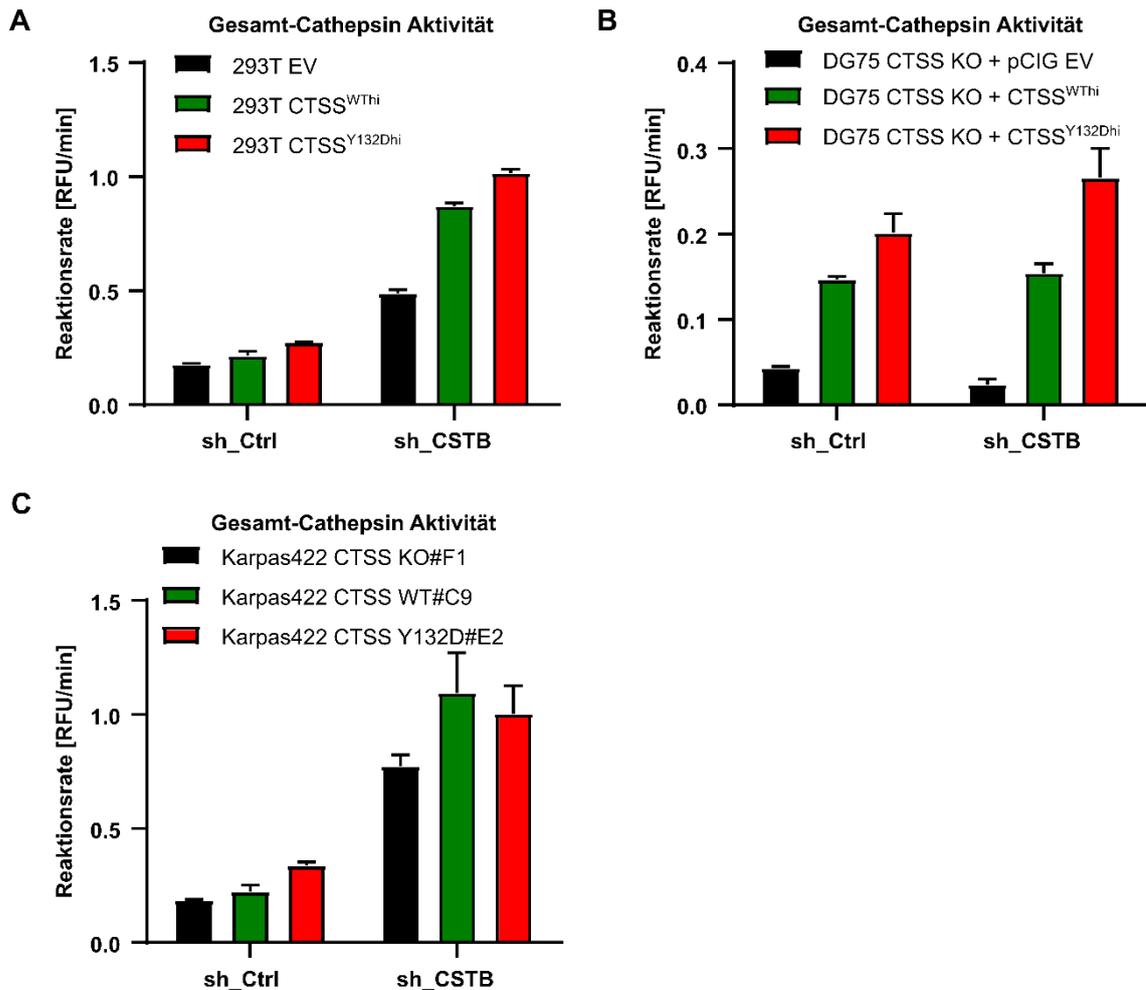


Abbildung 20 Gesamt-Cathepsin-Aktivität in Zelllinien mit CSTB Knockdown.

Zellysate von **A)** 293T, **B)** DG75 und **C)** Karpas422 wurden auf die Gesamt-Cathepsin-Aktivität untersucht. Dargestellt ist die Steigung der Reaktion zwischen 0 und 1500 Sekunden. Als Substrat wurde Z-FR-AMC verwendet. sh_Ctrl = nicht-zielgerichtete shRNA; sh_CSTB = shRNA gegen CSTB; RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.

4.8.2 Expressionsmuster von *CSTB* in single-cell (sc) RNA-seq Daten von Patienten mit FL

Weil wir zuvor den klinischen Stellenwert von CTSS-Hyperaktivität gezeigt hatten, wollten wir nun den Stellenwert des CTSS-Inhibitors CSTB in humanem FL untersuchen. Dazu werteten wir zuvor veröffentlichte scRNA-seq Daten von Lymphomproben von insgesamt 10 Patienten mit rezidiviertem FL (Haebe, Shree et al. 2021) aus. Zuerst haben wir die Zellen aller Patienten mittels Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) dargestellt und sie anhand ihres Genexpressionsprofil annotiert. Neben Tumorzellen konnten wir nicht-maligne B Zellen, Plasmazellen, T Zellen, natürliche Killerzellen (NK)/natürliche Killer-T Zellen (NKT) und myeloische Zellen identifizieren (**Abbildung 21A**). Vergleicht man die Gen-Expression von *CTSB* zwischen den unterschiedlichen

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Zell-Populationen, dann fällt auf, dass *CSTB* vor allem in proliferierenden Zellen, myeloischen Zellen, Tumorzellen und T Zellen stark exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist *CSTB* kaum in den nicht-malignen B- und Plasmazellen exprimiert (**Abbildung 21A-D**). Vergleicht man die *CSTB*-Expression direkt zwischen den Tumorzellen und nicht-malignen B Zellen pro Patient, dann weisen die Tumorzellen ein signifikant höheres *CSTB*-Level auf ($p=0,0021$) (**Abbildung 21D+E**). Andere endogene Cathepsin-Inhibitoren der Cystatin Familien 1-3 waren bei Patienten mit FL kaum exprimiert. Zusätzlich zu CTSS wurden auch Cathepsin B und H in Tumorzellen höher als in nicht-malignen B Zellen exprimiert (**Abbildung 21F**). Allerdings wirkte sich *CSTB* k/d nicht auf deren Substratschneideaktivität aus (**Anhang 3A+B**).

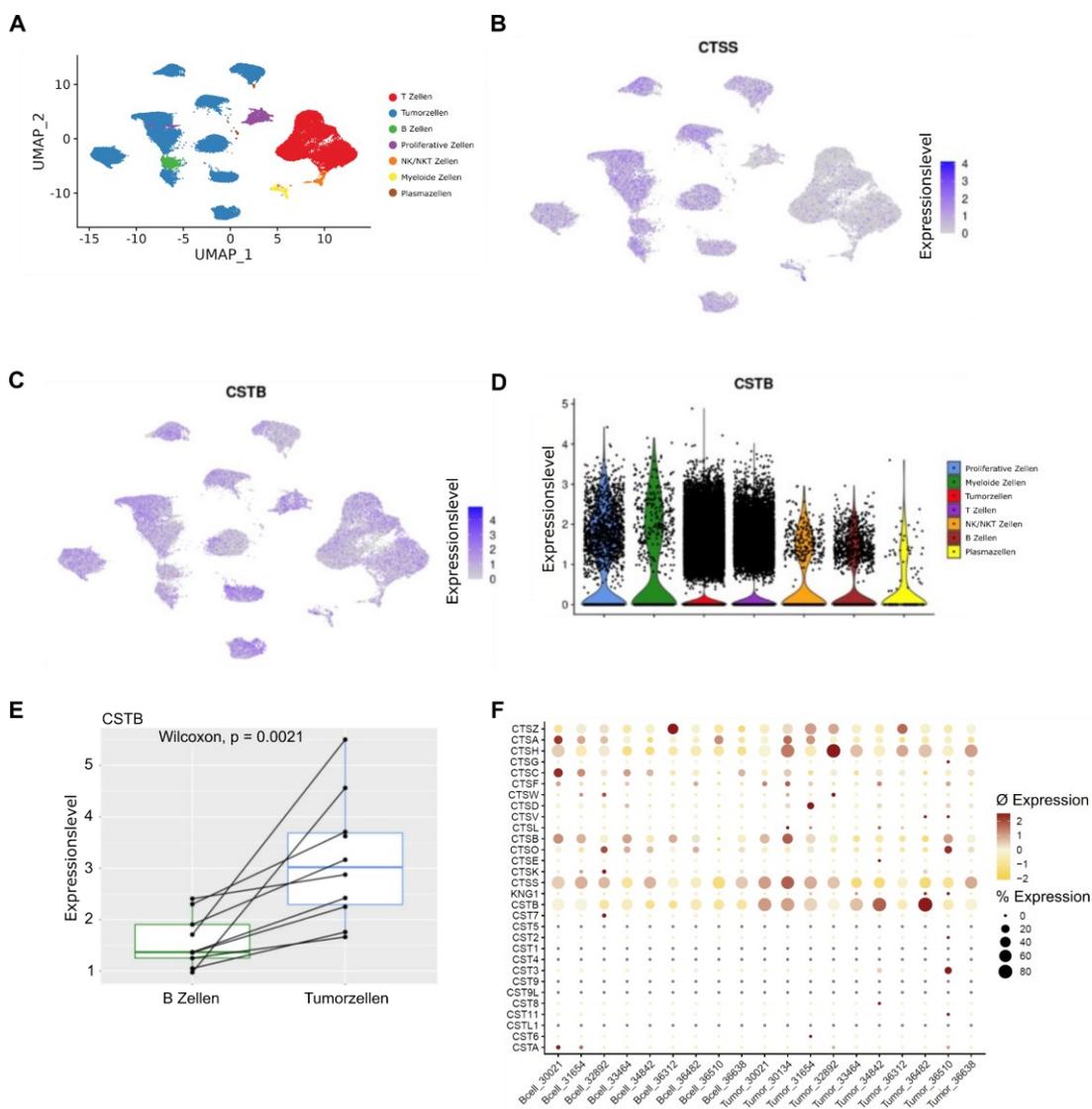


Abbildung 21: *CSTB*-Expression bei FL in sc-RNA-seq Daten.

A) Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) der sc-RNA-seq Daten von 10 Patienten mit FL. Die Zellen sind anhand ihres Genexpressionsprofil gefärbt. **B+C)** Gleiche UMAP-Darstellung wie in Panel (A), mit der Ausnahme, dass die Zellen nun anhand ihrer (B) *CTSS*- oder ihrer (C) *CSTB*-Expression gefärbt

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

sind. Die Skala reicht von 0 (keine Expression) bis 4 (hohe Expression). **D)** Der Violin-Plot zeigt das *CSTB*-Expressionslevel für jede in Panel A identifizierte Zell-Population **E)** Vergleich des *CSTB*-Expressionslevels zwischen B Zellen und Tumorzellen für jeden Patienten; p-Wert aus dem Wilcoxon-Test. **F)** Vergleich der Expression der Cathepsine und deren endogene Inhibitoren (*CTS* = Cathepsin, *KNG* = Kininogen, *CST* = Cystatin, \emptyset Expression = Durchschnittliche Expression aller Zellen, % Expression = prozentualer Anteil aller Zellen, die die jeweilige RNA exprimieren) in Tumor- und dazugehörigen B Zellen aller Patienten.

Daraus schlussfolgere ich, dass *CSTB* in malignen B Zellen höher als in normalen B Zellen exprimiert wird und vermutlich der einzige endogene Cathepsin-Inhibitor mit relevanter Expression in malignen B Zellen ist.

4.8.3 Therapieansprechen von Lymphomen mit CTSS-Hyperaktivität

Als nächstes untersuchte ich, wie sich die Freisetzung von CTSS und der *CSTB* k/d auf den lysosomalen Zelltod (LCD) auswirkten. LCD ist ein regulierter Zelltodweg, der durch die Destabilisierung der Lysosomen (z.B. durch LMP-induzierende compounds wie LLOMe) und anschließender Freisetzung des lysosomalen Inhalts, einschließlich der Cathepsine, in das Zytoplasma gekennzeichnet ist, was schließlich über verschiedene Signalwege zum Zelltod führen kann (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

Dafür verwendete ich wieder die zuvor verwendeten B-NHL Zelllinien (Karpas422 und DG75) mit und ohne *CSTB* k/d. Eine Western Blot Analyse bestätigte auch in diesen Zelllinien die starke Abnahme von *CSTB* (**Abbildung 22C**), sowie eine gesteigerte Substratspaltungsaktivität (**Abbildung 22D**).

Dann untersuchte ich den Einfluss von LLOMe auf die Zellviabilität mittels Cell Titer Glo (CTG) und auf die Apoptose mittels Annexin V (AnnV). In Karpas422 war in beiden read-outs eine niedrige Zellviabilität in *CTSS*^{WT} und *CTSS*^{Y132D} Zellen gegenüber *CTSS*^{KO} Zellen zu beobachten. Die Zellviabilität konnte mit *CSTB* k/d weiter verringert werden (**Abbildung 22A**). In DG75 war auch in beiden read-outs eine niedrige Zellviabilität von Zellen mit hoher CTSS-Aktivität (*CTSS*^{WThi} und *CTSS*^{Y132Dhi}) gegenüber Kontrollzellen (*CTSS*^{KO} mit Überexpression des EV) zu beobachten. Auch hier wurde der Effekt mit *CSTB* k/d besonders deutlich (**Abbildung 22B**).

Anschließend generierte ich zusätzlich weitere B-NHL Zelllinien (OCI-Ly8, HBL1, Z138) mit und ohne *CSTB* k/d. Eine Western Blot Analyse bestätigte auch in diesen Zelllinien die starke Abnahme von *CSTB* (**Abbildung 22C**), sowie eine gesteigerte Substratspaltungsaktivität mit *CSTB* k/d (**Abbildung 22D**). CTG mit diesen B-NHL Zelllinien bestätigte die niedrigere Zellviabilität nach LLOMe Behandlung und *CSTB* k/d (**Abbildung 22E-G**). Dabei fiel auf, dass HBL-1 unter den drei Zelllinien die niedrigsten endogenen *CSTB* Levels aufwies und auch ohne *CSTB* k/d bei 300 μ M LLOMe bereits eine verringerte Zellviabilität zeigte (**Abbildung 22C+F**).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

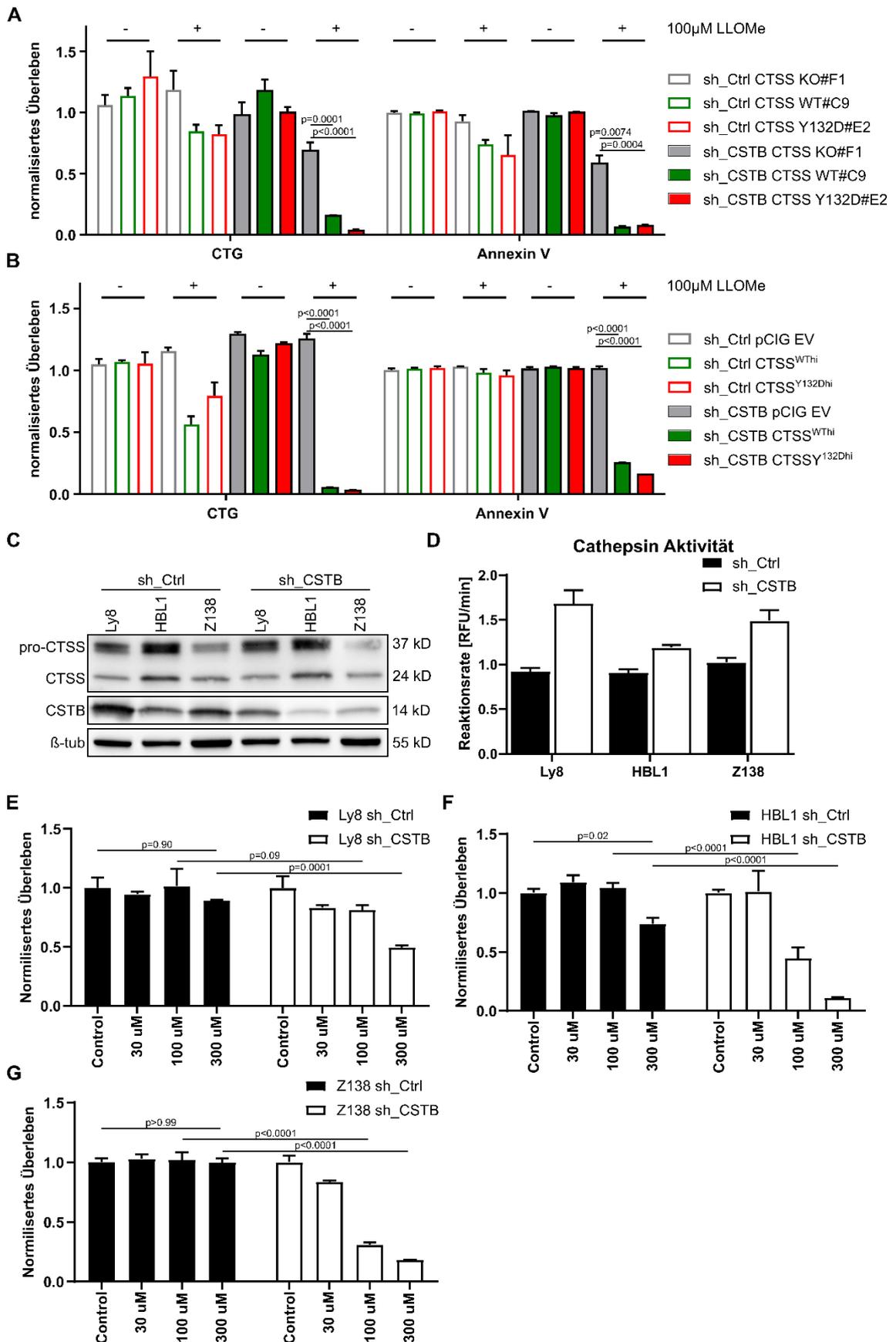


Abbildung 22 CTSS-Hyperaktivität sensitiviert gegenüber LLOMe in B-NHL Zelllinien.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

A) Karpas422 Zellen mit angegebenem CTSS und CSTB Status wurden für 20 Stdn mit 100 μ M LLOMe oder DMSO behandelt und deren Überleben mit den zwei angegebenen Assays untersucht: Cell Titer Glo (CTG), und Annexin V/DAPI negative Zellen. Normalisiert auf DMSO behandelte CTSS^{KO} sh_Ctrl Zellen. Ein repräsentatives Experiment ist in **Anhang 4** dargestellt. **B)** Wie in A) mit DG75 Zellen. **C)** Western Blot des CSTB k/d in OCI-Ly8, HBL1, und Z138. **D)** Zelllysate von Ly8, HBL1 und Z138 wurden auf die Gesamt-Cathepsin-Aktivität untersucht. Dargestellt ist die Steigung der Reaktion zwischen 0 und 1500 Sekunden. Als Substrat wurde Z-FR-AMC verwendet. **E-G)** CTG mit angegebenen LLOMe Konzentrationen für 20 Stdn für OCI-Ly8 (D), HBL1 (E), und Z138 (F) B-NHL Zellen mit und ohne CSTB k/d. Normalisiert auf DMSO behandelte Zellen. Sh_Ctrl = nicht-zielgerichtete shRNA; sh_CSTB = shRNA gegen CSTB; RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.

Um den molekularen Mechanismus des LLOMe vermittelten Zelltods genauer zu verstehen habe ich Lysate von LLOMe behandelten Karpas422 Zellen auf Mitglieder der BCL2-Familie mit Western Blot untersucht. Generell war in Zellen mit höherer CTSS-Aktivität etwas weniger BCL2 vorhanden, auch ohne Induzierung von LMP (**Abbildung 23A**, 0 Std). Weiterhin wurde die BCL2 Bande besonders in LLOMe behandelten CTSS^{Y132D} Zellen schwächer (**Abbildung 23A**, 2/20 Std). Außerdem waren niedrige CSTB Level in CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} Zellen zu beobachten (**Abbildung 23A**). In Zellen mit CSTB k/d waren die BCL2 Level ohne LLOMe Behandlung deutlich verringert. Weiterhin wurde in unbehandelten CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} CTSB k/d Zellen MCL1 gespalten (**Abbildung 23B**). CSTB k/d Zellen wurden nur mit 10 μ M LLOMe behandelt (auf Grund zu hoher Toxizität von LLOMe in diesen Zellen, wie in **Abbildung 22** zu sehen war), was zu einer zunehmenden Spaltung von MCL1 in CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D} Zellen, sowie einer Spaltung von BID in CTSS^{Y132D} führte (**Abbildung 23B**).

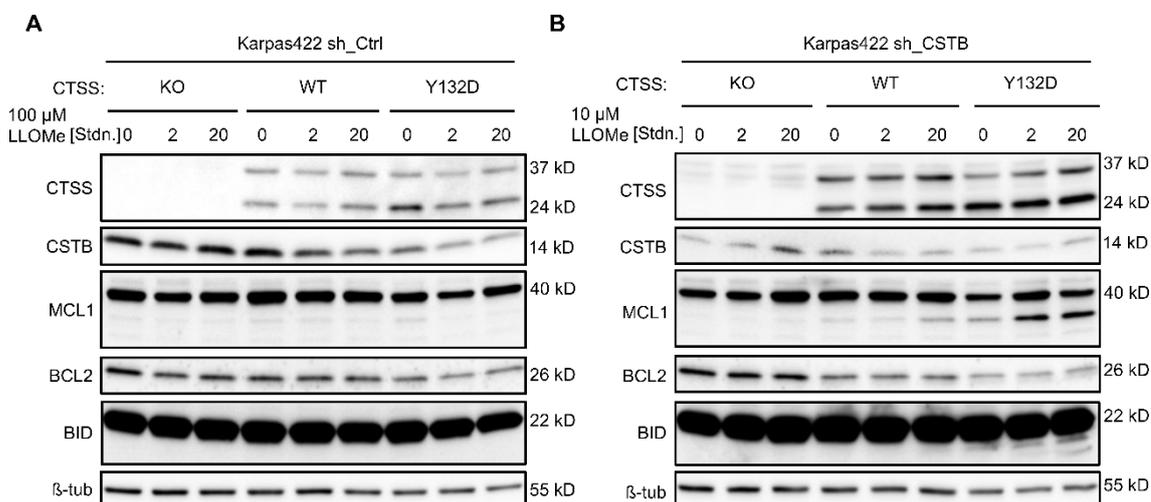


Abbildung 23 Die Auswirkung von CTSS-Hyperaktivität auf BCL2 Family Proteine.

A) Western Blot von Karpas422 sh_Ctrl Zellen nach Behandlung mit 100 μ M LLOMe für die angegebenen Zeitpunkte. **B)** Wie in A) nur mit Karpas422 sh_CSTB Zellen und 10 μ M LLOMe. Std. = Stunden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass LLOMe (vermutlich über LMP und LCD) eine vielversprechende neue therapeutische Strategie bei Tumoren mit CTSS-Hyperaktivität ist und niedrige CSTB Level die Wirkung von LLOMe auf die Zellviabilität verstärken.

5. Diskussion

In dieser Doktorarbeit habe ich den molekularen Mechanismus für CTSS-Hyperaktivität, den Einfluss von CTSS-Hyperaktivität in Lymphomzellen, den Einfluss von CTSS-Hyperaktivität auf die Interaktion mit dem TME, und therapeutische Vulnerabilitäten von CTSS-hyperaktiven Tumoren untersucht.

Dazu habe ich folgende Hauptergebnisse erzielt:

- (i) CTSS-Hyperaktivität ist ein häufiger Befund bei >20% der FL. Grundlage für die erhöhte Aktivität sind genetische Veränderungen, die zu mehr katalytisch aktivem CTSS führen, entweder mittels erhöhter CTSS-Expression (v.a. mittels CN gain) oder mittels CTSS^{Y132}-Mutation.
- (ii) Molekulare Simulationen und massenspektrometrische Daten stützen die Hypothese, dass die Abstände der katalytisch aktiven Triade zur Prodomäne durch CTSS^{Y132}-Mutation verkürzt werden und somit die autokatalytische Umwandlung von pro-CTSS zu aktivem CTSS beschleunigt stattfindet.
- (iii) B-NHL Zellen mit CTSS-Hyperaktivität prozessieren u.a. mehr CD74 und aktivieren antigenspezifische CD4⁺ T Zellen effizienter, was die Immunumgebung und besonders die CD4⁺/CD8⁺ Ratio in meinem Lymphom-ähnlichen Mausmodell beeinflusste. Immunkompetente Mäuse mit CTSS-Hyperaktivität zeigten außerdem ein beschleunigtes Tumorwachstum.
- (iv) Patienten mit CTSS-hyperaktiven FL hatten mit einer Standard Immunotherapie (R-CHOP) seltener ein frühes Therapieversagen (weniger POD24 events).
- (v) Der endogene Cathepsin Inhibitor CSTB bindet und inhibiert CTSS in B-NHL Zellen und ist in humanen FL Tumorzellen im Vergleich zu B Zellen signifikant hochreguliert.
- (vi) CSTB k/d erhöht die Substratspalteaktivität von CTSS in Zelllysaten. B-NHL Zellen mit CTSS-Hyperaktivität zeigten niedrigere Zellviabilität nach LLOMe. CSTB k/d verstärkte den Effekt.
- (vii) B-NHL Zellen mit CTSS-Hyperaktivität zeigten niedrigere Level an CSTB und anti-apoptotischem BCL2. Außerdem wurden in diesen Zellen mehr anti-apoptotisches MCL1 und pro-apoptotisches BID prozessiert.

Im den folgenden Abschnitten sollen diese Hauptergebnisse diskutiert werden.

5.1 Molekulare Mechanismen der CTSS-Hyperaktivität

5.1.1 Selektionsdruck für CTSS^{Y132}-Mutationen

Rekurrente somatische Mutationen im codierenden Bereich sind bei FL zunehmend gut kartiert und deren Integration hat die Risikostratifizierung bei Patienten mit fortgeschrittenem FL deutlich verbessert (Pastore, Jurinovic et al. 2015, Jurinovic, Kridel et al. 2016, Weigert and Weinstock 2017).

Der besondere Fall eines FLs, das von einer Zellpopulation ohne CTSS^{Y132}-Mutation stammte, aber später in beiden Patienten unterschiedliche CTSS^{Y132}-Mutationen gefunden wurden, veranschaulichte, dass CTSS^{Y132}-Mutationen unabhängig voneinander erworben wurden und in beiden FLs jeweils ein Selektionsdruck für Mutationen an der Stelle CTSS^{Y132} herrschte. Der zweite Hinweis für eine positive Selektion von CTSS-Mutationen ist die Anhäufung somatischer Missense-Mutationen in CTSS an einem einzigen Mutations-Hotspot, CTSS^{Y132}. CTSS^{Y132}-Mutationen waren in unserer Kohorte in 7 von 12 Fällen subklonal (58%), was auch für einen späteren Erwerb der Mutationen spricht.

Obwohl CTSS^{Y132S}, als weitere identifizierte CTSS-Mutation, in ähnlicher Weise, die *in vitro* Spaltungsaktivität erhöht, ist CTSS^{Y132D} bei weitem die häufigste CTSS-Mutation. Der Grund für diese Bevorzugung ist unklar, könnte aber z.B. mit dem Entstehungsprozess dieser Mutation zusammenhängen. Verschiedene Krebsarten haben zum Teil spezifische Mutationssignaturen, das heißt, charakteristische Kombinationen von Mutationen und Mutationstypen, die durch einen bestimmten mutagenen Prozess entstanden sind (Alexandrov, Nik-Zainal et al. 2013). Maligne B Zell-Lymphome, die somatische Hypermutation durchlaufen haben, werden der Mutationssignatur 9 zugeordnet (Alexandrov, Nik-Zainal et al. 2013). Diese Signatur zeichnet sich durch den Austausch von Thymin (T) durch Guanin (G) an ATN- und TTN-Trinukleotiden aus und entsteht vermutlich durch das Zusammenspiel der Aktivierungsinduzierten Cytidin-Desaminase (AID) und der fehleranfälligen Polymerase η (Di Noia and Neuberger 2007, Alexandrov, Nik-Zainal et al. 2013). Diese T>G Transversionen passen zu den CTSS^{Y132D}-Mutationen. Zusätzlich könnte eine CTSS^{Y132D}-Mutation weitere selektive Vorteile gegenüber anderen CTSS^{Y132}-Mutationen haben, die wir bisher nicht analysieren konnten. Obwohl die Signatur 9 weiteren B Zell Lymphomen zugeordnet wird (Alexandrov, Nik-Zainal et al. 2013), konnten CTSS^{Y132}-Mutationen – bis auf einen Patienten mit DLBCL (Schmitz, Wright et al. 2018, Dheilly, Battistello et al. 2020) – nur beim FL nachgewiesen werden (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>; Stand 08.02.2023). Allerdings könnte dieses eine

DLBCL auch aus einem transformierten FL entstanden sein. Mittlerweile liegen zunehmend Whole-Exome-Sequenzierungsdaten (WES) und Whole-Genome-Sequenzierungsdaten (WGS) vor, was zukünftigen Arbeiten ermöglicht, zu überprüfen, ob CTSS-Mutationen in anderen Lymphomen und weiteren hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankungen vorkommen. Viele reife B Zell-Lymphome weisen eine hohe CTSS-Expression auf (Harvard 2018, Dheilly, Battistello et al. 2020), woraus sich vermuten lässt, dass CTSS auch bei anderen B Zell-Lymphomen funktionell relevant ist. Mit Hilfe des *k-means* Algorithmus identifizierten wir in unseren Daten 11 Fälle mit hoher CTSS-Expression (22%), darunter 8 Fälle mit CTSS CN neutral, was auch in FL auf zusätzliche Mechanismen der transkriptionellen Dysregulation von CTSS hindeutet.

5.1.2 CTSS^{Y132}-Mutationen erhöhen die autokatalytische Umwandlung von pro-CTSS zu katalytisch aktivem CTSS

Meine funktionellen Daten und die Strukturmodellierung zeigen, dass CTSS durch CTSS^{Y132D}-Mutation einen Funktionsgewinn erlangt, indem die Umwandlung von enzymatisch inaktivem pro-CTSS in katalytisch aktives CTSS beschleunigt wird. Insgesamt stützen die vorliegenden massenspektrometrischen Daten die Hypothese, dass CTSS^{Y132}-Mutationen zu intramolekularen Strukturveränderungen führen, die mit einer Verkürzung der Abstände zwischen CTSS^{C139} der katalytischen Triade und einem Peptidabschnitt der Proform (zwischen CTSS^{H79} und CTSS^{I114}) einhergehen und so die autokatalytische Umwandlung, über ein oder mehrere Intermediate, erleichtern. Nach der Analyse der semi-tryptischen Peptide aus **Abbildung 9F** wäre es auch möglich, dass innerhalb von CTSS mindestens zwei autokatalytische Spaltstellen (G81-D82 und T84-S85) vorhanden sind. Beide befänden sich in unmittelbarer Nähe der bereits bekannten und auch in meiner Arbeit bestätigten Spaltstelle CTSS^{S93}-CTSS^{S94} (Quraishi and Storer 2001). Eine weitere Publikation zu CTSS^{Y132D}-Mutationen beschreibt eine Beteiligung von CTSS^{Y132} an der Substratbindestelle von CTSS. CTSS^{Y132D} verändert die elektrostatische Spannung von neutraler bis schwach positiver Ladung zu einer negativen Ladung. Wie das genau die Umwandlung beschleunigen soll, wurde nicht beschrieben (Dheilly, Battistello et al. 2020). Denkbar wäre eine gesteigerte Affinität zu positiv geladenen Bereichen der pro-Domäne. Weiterhin wurde eine Veränderung der Wasserstoffbrücken zwischen CTSS^{H79} und CTSS^{Y132} durch CTSS^{Y132D}-Mutation vermutet (Dheilly, Battistello et al. 2020). Dennoch könnte CTSS^{H79} eine Schnittstelle der katalytischen Triade darstellen, die für ein CTSS Intermediat verantwortlich ist. Der steilere Anstieg von CTSS^{Y132D} flacht nach 2 bis 4 Std ab, was darauf hindeutet, dass aktives CTSS^{Y132D} und CTSS^{WT} nach der Umwandlung ähnliche proteolytische Aktivitäten aufweisen. Das

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Fazit aus unserem Modell ist, dass CTSS^{Y132D} die Aktivität des reifen Enzyms *per se* nicht erhöht, sondern nur die Umwandlung von pro-CTSS in katalytisch aktives CTSS beschleunigt. Mutation in anderen Cathepsinen sind bisher nur mit einer Abnahme oder kompletten Verlust der Aktivität assoziiert (Ketterer, Gomez-Auli et al. 2017), somit sind CTSS^{Y132}-Mutationen wohl die ersten beschriebenen aktivierenden Mutationen unter den Cathepsinen.

5.2 CTSS^{Y132}-Mutationen erhöhen die CD4⁺ T Zell Aktivierung

Es ist lange bekannt, dass die proteolytischen Eigenschaften von CTSS eine wichtige Rolle beim Abbau von CD74 und der Prozessierung von Antigenen für deren Präsentation of MHC-II in B Zellen spielen (Riese, Mitchell et al. 1998). In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass CTSS-Hyperaktivität zu einer erhöhten CD74-Prozessierung und CD4⁺ T Zell Aktivierung *in vitro* führt. Weiterhin konnte ich eine erhöhte CD4⁺/CD8⁺ Ratio und ein beschleunigtes Tumorwachstum im Mausmodell zeigen. Die erhöhte CD4⁺/CD8⁺ Ratio bestätigte sich in FL Tumorbiopsien vor Behandlungsbeginn. Unsere Daten deuten also eine entscheidende Rolle von CD4⁺ T Zellen bei der Progression von CTSS-hyperaktiven Tumoren hin. Wichtig ist auch, dass es höchst unwahrscheinlich ist, dass CTSS^{Y132D} *per se* immunogen ist, da bioinformatische Analysen zeigten, dass CTSS^{Y132} nicht an repräsentative MHC-II-Allele (25 HLA-DR, 20 HLA-DQ und 9 HLA-DP) binden kann (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Der hohe Anteil subklonaler CTSS-Mutationen lässt vermuten, dass wenige dieser Tumorzellen ausreichend sind, um tumorfördernde T Zellen zu aktivieren und reziprok mit deren wachstumsfördernden Signalen versorgt werden. Vergleich der Immunprofile zeigte in FL mit CTSS^{Y132}-Mutation auch unterschiedliche Expressionsmuster in Genen der Kategorien Antigen Prozessierung (z.B. MHC-II Gene *HLA-DQA1* und *HLA-DQB1*) und Chemokine (z.B. *CXCL13*, *IFN-γ* und *IFN-γR1*) (Bararia, Hildebrand et al. 2020).

Beim Menschen wird *CXCL13* stark von FDCs exprimiert, was für die Rekrutierung von reifen CXCR5⁺ B Zellen und T_{FH} Zellen sorgt (Kazanietz, Durando et al. 2019). Es wurde aber auch gezeigt, dass *CXCL13* in hohen Mengen von PD1⁺ GC CD4⁺ T_{FH} Zellen produziert wird (Kim, Lim et al. 2004, Rasheed, Rahn et al. 2006).

Da wir direkte aktivierende Effekte CTSS-hyperaktiver Zellen auf CD4⁺ T Zellen beobachten konnten, lässt sich vermuten, dass die hohe *CXCL13*-Expression von einer Anreicherung der T_{FH} im Tumor stammt. Generell, könnten co-stimulatorische Signale der CD4⁺ T_{FH} die Ursache für ein beschleunigtes Tumorwachstum gewesen sein.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass CD4⁺ T Zellen das Wachstum humaner FL Zellen *in vitro* (Umetsu, Esserman et al. 1990, Scott and Gascoyne 2014) und in einem Mausmodell (Tsiagbe, Asakawa et al. 1993, Scott and Gascoyne 2014) unterstützen können, doch die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen bleiben unklar.

Unser Modell lässt dazu auch keine eindeutige Aussage treffen, da die genaue Zusammensetzung SRBC aktivierter GC Zellen nicht klar definiert war. Weiterhin konnten die FACS-Analysen nur mit gefrorenem Material durchgeführt werden, was zur deutlichen Reduktion bestimmter Zelltypen und Qualität der Proben führen kann (Reimann, Chernoff et al. 2000). Außerdem führt die Transplantation von A20 Zellen in BALB/c Mäuse generell zu Tumorwachstum und spiegelt daher eher aggressive B-NHL wider. Weitere Modellsysteme sind daher nötig, um die komplexen zellulären Zusammensetzungen und die wechselseitigen Interaktionen innerhalb des TME *in vivo* analysieren zu können. Dazu könnten beispielsweise hämatopoetische Vorläuferzellen (HSPCs) aus dem Knochenmark von Bcl2-transgenen Mäusen (z.B. Emu-Bcl2 oder VavP-Bcl2) mit und ohne Cre-Expression in der B-Linie (z.B. CD19-Cre oder Mb1-Cre) verwendet werden (Strasser, Elefanty et al. 1996, Rickert, Roes et al. 1997, Ogilvy, Metcalf et al. 1999, Hobeika, Thiemann et al. 2006). Cre-regulierte retrovirale Vektoren (Turner, Gardam et al. 2010) ermöglichen die B-Linien-spezifische Expression von Ctss^{WT}, Ctss^{Y140D} (dem Maus-Homolog von CTSS^{Y132D}) oder EV. Solch ein Modell ist physiologischer und kann dazu dienen die Expansion autologer, antigen-spezifischer T Zellen und die Wechselwirkungen mit den Tumorzellen longitudinal zu untersuchen. Um den Effekt Antigen-spezifischer T Zellen genauer zu untersuchen könnten alternativ OT-II Mäuse transplantiert und Ovalbumin (OVA) als Antigen verwendet werden. Die T Zellen der OT-II Mäuse können die OVA-Peptide 323-339 erkennen, wenn sie auf MHC-II präsentiert werden (Barnden, Allison et al. 1998).

Die Machbarkeit dieses Ansatzes konnte in den Grundlagen in einem sehr komplementären Manuskript der Arbeitsgruppe von Elisa Oricchio an der EPFL in Lausanne/Schweiz, das zur gleichen Zeit wie meines veröffentlicht wurde (back-to-back), mit HSPCs aus der fötalen Leber von VavP-Bcl2 transgenen Mäusen, die in sublethal bestrahlte C57BL/6 Mäuse transplantiert wurden, gezeigt werden (**Tabelle 2** zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Manuskripte). Transplantierte Mäuse entwickelten innerhalb von 50 Tagen Lymphome und die CTSS Überexpression konnte in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Außerdem waren in Mäusen mit CTSS-Hyperaktivität erhöhte Mengen PD1⁺ CXCR5⁺ CD4⁺ T_{FH} vorhanden. Genauere Analyse der GCs mittels IF bestätigte auch die höhere Ratio von CD4⁺ zu CD8⁺ T Zellen in Mäusen mit CTSS-Hyperaktivität (und wurde auch in Proben von Patienten mit FL bestätigt).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Depletion aller CD4⁺ T Zellen verhinderte die Tumorentstehung in den Mäusen (Dheilly, Battistello et al. 2020).

Zusammenfassend zeigen die beide Manuskripte, dass CTSS-Hyperaktivität zu mehr CD4⁺ T Zellen und einer höheren CD4/CD8 Ratio, und CTSS^{KO} / Hemmung zu mehr CD8⁺ T Zellen und einer geringeren CD4/CD8 Ratio in FL führt. Zusätzliche Funktionsstudien in repräsentativen *in vivo* Modellen, einschließlich Zelldepletionsexperimenten (z.B. spezifische Depletion von CD4⁺ T_{FH} Zellen *in vivo*), sind erforderlich, um den gesamten Umfang der direkten und indirekten Auswirkungen der aberranten CTSS-Hyperaktivität auf die komplexen Interaktionen mit verschiedenen Komponenten des TME zu erfassen.

Tabelle 2 Gegenüberstellung zweier gleichzeitiger Veröffentlichungen (back-to-back Veröffentlichung) zu CTSS Alterationen in FL.

Die Arbeit von (Dheilly, Battistello et al. 2020) fokussiert sich auf	Diese Doktorarbeit und meine Publikation (Bararia, Hildebrand et al. 2020) fokussieren sich auf
Veränderung der elektrostatischen Spannung durch die CTSS ^{Y132D} -Mutation	Intramolekulare Strukturveränderungen durch CTSS ^{Y132D} -Mutationen
Mausmodell mit CTSS-Hyperaktivität in HSPCs aus der fötalen Leber von VavP-Bcl2 transgenen Mäusen	Digital multiplex gene expression profiling, IHC und Multispektrale Bildanalyse primärer FL .
Mausmodell und Unterschiede im Tumorstadium von in BALB/c transplantierten A20 mit und ohne CTSS ^{KO}	Mausmodell und Unterschiede im Tumorstadium von in BALB/c transplantierten A20 mit Überexpression von CTSS ^{WT} und CTSS ^{Y132D} vs endogener CTSS ^{WT} mit EV und mit supportivem TME
Co-Kultur von vavP-Bcl2 und A20 Lymphomzellen mit und ohne CTSS ^{KO} mit antigen-spezifischen, humanen T Zellen	Co-Kultur von B-NHL Zellen mit Überexpression von CTSS ^{WT} und CTSS ^{Y132D} vs endogener CTSS ^{WT} oder EV mit antigen-spezifischen, humanen T Zellen
Biologie von CTSS^{KO} / Hemmung im Mausmodell	Biologie der CTSS-Mutationen/ Überexpression (CTSS-Hyperaktivität) in primären FL
Anti-Tumor Immunität (mit CTSS ^{KO} /Hemmung von CTSS)	Tumor-unterstützende Immunität (mit CTSS-Hyperaktivität)
Rationale für die Auslösung/Verstärkung von Anti-Tumor-Reaktionen (durch Hemmung von CTSS in Kombination mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren)	Rationale für die gezielte Ausschaltung der tumorunterstützenden Mikroumgebung (z. B. mit immunsuppressiver/zytostatischer Chemotherapie) als therapeutisches Prinzip
Gemeinsamkeiten	
<ul style="list-style-type: none"> - Identifizierung von CTSS^{Y132D} als rekurrente Mutation in FL. - CTSS^{Y132D}-Mutation führt zu einer erhöhten Ratio von aktivem zu pro-CTSS und einer erhöhten Substratspaltungsaktivität. - CTSS-Hyperaktivität führt zu erhöhter CD74 Prozessierung. - CTSS-Hyperaktivität führt zu einem mit CD4⁺ T Zellen angereichertem TME und einer erhöhten CD4/CD8 Ratio. 	

5.3 Einfluss der CTSS-Hyperaktivität auf die Behandlungsergebnisse bei Patienten, die eine Immunchemotherapie erhalten

In Mausmodellen förderte die CTSS-induzierte Immunmikroumgebung das Tumorstadium. Bei Patienten sind der natürliche Verlauf und die Wachstumskinetik unbehandelter FL mit und ohne CTSS-Hyperaktivität noch unbekannt. Allerdings hatten Patienten mit CTSS-hyperaktiven FL weniger oft ein frühes Therapieversagen. Es wurde bereits gezeigt, dass eine aktivierte Immunmikroumgebung und das Vorhandensein intrafollikulärer CD4⁺ T Zellen mit geringen Raten an frühem Therapieversagen in FL zusammenhängt, die mit Immunchemotherapie behandelt wurden (Tobin, Keane et al. 2019, Mondello, Fama et al. 2021). Da wir in zwei unabhängigen klinischen Kohorten in Patienten mit CTSS-Hyperaktivität, die eine Immunchemotherapie erhalten hatten, geringe Raten an frühem Therapieversagen beobachten konnten, besteht die Möglichkeit, dass die Immunchemotherapie auch das supportive TME getroffen hat. Es wäre denkbar, dass gerade CTSS-hyperaktive FL besonders stark von deren TME abhängig sind, was durch die immunsuppressiven Bestandteile der Immunchemotherapie gestört wurde.

Das Manuskript von Dheilily *et al.* hat einen etwas anderen Fokus und konzentriert sich v.a. auf die gezielte Inhibierung von CTSS in Mausmodellen (**Tabelle 2**). CTSS^{KO} / Hemmung diversifizierte das Antigen-Repertoire, das auf MHC-I präsentiert wurde, was wiederum die CD8⁺-T Zell-Infiltration förderte. In humanen FL war niedrige CTSS-Expression mit einer erhöhten *PDCD1*-Expression assoziiert. Zweiwöchige Behandlung der Patienten mit niedriger CTSS-Expression mit Anti-PD1 führte zu höherer *PDCD1*-Expression, was auf die Aktivierung und die Rekrutierung von CD8⁺ PD1⁺ Zellen im Tumor zurückgeführt werden könnte (Dheilily, Battistello et al. 2020). Dheilily *et al.* postulieren daher, dass die Inhibierung von CTSS das Ansprechen auf anti-PD1 Therapie verbessert.

In unserer Arbeit zeigen wir jedoch, dass die CTSS-Hyperaktivität ausreicht, um unter Behandlung mit Immunchemotherapie geringe Raten an frühem Therapieversagen zu erzielen, was alternative Möglichkeiten bieten könnte die CTSS-Hyperaktivität therapeutisch bei Lymphomen und möglicherweise auch bei anderen Tumoren auszunutzen. Dafür ist aber ein genaueres Verständnis der intrazellulären Mechanismen der CTSS-Regulation notwendig.

5.4 Der Einfluss und die Bedeutung von erhöhter *CSTB*-Expression bei FL

CTSS ist auch an der Regulation von Zelltodmechanismen beteiligt (Olson and Joyce 2015). Nach lysosomaler Membranpermeabilisierung (LMP), die zum Teil natürlich während der Zellteilung auftritt (Hämälistö, Stahl et al. 2020) und durch das therapeutische Detergens LLOMe verstärkt induziert werden kann, können Cathepsine vermehrt in das Zytosol gelangen. Als Auswirkung der gesteigerten Proliferation von Krebszellen wäre es daher auch denkbar, dass mehr Cathepsine in das Zytosol freigesetzt werden. Eine Aufgabe zytosolischer Stefine ist es, der zytosolischen Aktivität lysosomaler Enzyme entgegenzuwirken (Turk, Turk et al. 2002).

In meiner Arbeit bestätigte sich, dass *CSTB* der einzige, relevante Kandidat war, der sowohl mit CTSS^{WT} als auch mit CTSS^{Y132D} signifikant co-immunopräzipitiert wurde. Weiterhin suggerieren meine Daten, dass *CSTB* ein Zell-intrinsischer CTSS Inhibitor ist und bestätigen damit vorherige Studien (Turk and Bode 1991, Turk, Stoka et al. 1995, Turk, Stoka et al. 1996, Kos, Krasovec et al. 2000, Rinne, Saukko et al. 2002, Turk, Stoka et al. 2008). Doch die Untersuchung von *CSTB* in FL ist bisher nicht beschrieben worden.

In meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass in Karpas422 B-NHL Zellen erhöhte Mengen an aktivem CTSS in Co-Immunopräzipitaten von CTSS^{Y132D}-Klonen auch zu erhöhten Mengen an *CSTB* führten, was suggeriert, dass *CSTB* katalytisch aktives CTSS, ähnlich wie bereits für Papain gezeigt wurde (**Abbildung 3**), bindet. Aufgrund der großen Mengen von co-immunopräzipitiertem *CSTB* vermutete ich einen starken Einfluss von *CSTB* auf die Nettoaktivität von CTSS in FL. In der Tat bestätigen die Aktivitätsmessungen in mehreren Zelllinien mit hohen CTSS Levels eine deutliche Zunahme der Netto-Cathepsin-Aktivität nach *CSTB* k/d im Vergleich zu CTSS^{KO}. Die Unterschiede waren größer als der Aktivitätsunterschied zwischen mit CTSS^{WT} und CTSS^{Y132D}, was suggeriert, dass die Netto-Cathepsin-Aktivität mehr von *CSTB* als von den CTSS Levels abhängt.

CTSS-Hyperaktivität im Lysosom bietet, vermutlich wegen erhöhter CD74- und Antigenprozessierung und mehr Tumor-supportivem TME, einen Selektionsvorteil für FL. Dem gegenüberstehend deuten unsere vorläufigen Daten darauf hin, dass CTSS im Zytosol (nach LMP und/oder *CSTB* k/d) den Zelltod von CTSS hyperaktiver FL / Tumoren auslösen oder verstärken.

Unterstützt werden diese Daten auch von einer Studie, die ein *CSTB*^{KO} Brustkrebsmausmodell genauer untersuchte. Isolierte Tumorzellen von *CSTB*^{KO} Mäusen wiesen vermehrt Apoptose nach LLOMe Behandlung als Wildtypzellen auf (Butinar, Prebanda et al. 2018).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

al. 2014). Bereits vor 23 Jahren hat eine Studie die prognostische Relevanz von CSTB und einer anderen lysosomalen Cysteinprotease, CTSB, im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich niedrige CSTB Level nur dann positiv auf das Gesamtüberleben unter Therapie auswirkten, wenn gleichzeitig hohe Cathepsin B Level nachgewiesen wurden (Kos, Krasovec et al. 2000). Einschränkend muss man erwähnen, dass (i) die Studie CTSB und nicht CTSS untersuchte, und (ii) die Messung der Level im Serum keinen Aufschluss auf die intrazellulären CSTB und CTSB Level geben kann. Dennoch sind die Beobachtungen der Studie der erste Nachweis für die klinische Relevanz der Bestimmung der Cathepsinaktivität und dessen Regulation bei Krebs. Auch bei Leber und Nierenkrebs ist eine hohe *CSTB*-Expression mit einem niedrigerem 5-Jahres-Überleben unter Therapie assoziiert (Weinstein, Collisson et al. 2013).

Eine hohe *CSTB*-Expression wurde bei weiteren hämatologischen Tumoren (Myelom, DLBCL, CLL, und AML) und soliden Tumoren (Eierstockkrebs, Lungenkrebs und Adenokarzinom des Pankreasganges) beobachtet (Uhlén, Fagerberg et al. 2015). Die klinische Relevanz der *CSTB*-Expression in diesen Erkrankungen ist jedoch, wie beim FL, ungeklärt.

5.5 Auswirkungen zytosolischer Cathepsin Hyperaktivität

Viele Standardkrebstherapien können LMP auslösen (Serrano-Puebla and Boya 2018). Dabei kann der Inhalt der Lysosomen in das Zytosol gelangen und den Lysosom-vermittelten Zelltod auslösen (**Abbildung 24**) (Mediavilla-Varela, Pacheco et al. 2009) (Groth-Pedersen, Ostenfeld et al. 2007, Alduaij, Ivanov et al. 2011, Halaby 2021). Es ist jedoch für die meisten Standardkrebstherapien unklar, ob LMP aufgrund der direkten Wirkung der Therapie oder als Folge des durch die Therapie induzierten Zelltods ausgelöst wird (Serrano-Puebla and Boya 2018).

5.5.1 Relevanz von Stefin B (CSTB)

In Anbetracht der Tatsache, dass Patienten mit CTSS-hyperaktiven FL weniger frühes Therapieversagen mit Standard-Immunchemotherapien hatten, kamen wir zu der Hypothese, dass diese Therapien LMP induzieren und sich somit die *CSTB* Level im Zytosol auf das Therapieansprechen auswirken könnten.

Die scRNA-seq Daten dieser Arbeit zeigen, dass *CSTB* in FL Zellen höher als in gesunden B Zellen exprimiert wird. Weiterhin bestätigt ein unabhängiger, öffentlich zugänglicher scRNA-seq Datensatz einiger Organe die niedrige *CSTB*-Expression in B Zellen

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

(He, Wang et al. 2020). Natürlich auftretende LMP während der Zellteilung und die damit verbundene erhöhte CTSS-Aktivität im Zytosol könnte durch einen entsprechenden Anstieg von CSTB ausgeglichen werden und somit einen Schutzmechanismus der FL Zellen darstellen. Dagegen spricht, dass die Überexpression von CTSS in meinen B-NHL Zellen nicht zu erhöhten CSTB Leveln im Western Blot führte, sondern die CSTB Level mit höheren CTSS Levels abnahmen. Weiterhin könnte die *CSTB* Überexpression eine eigene bisher unerkannte eigene Alteration in FL sein, die nicht primär mit CTSS in Verbindung steht.

Die Interaktion aus CTSS und CSTB geschieht hauptsächlich durch hydrophobe Verbindungen (Stubbs, Laber et al. 1990, Tusar, Usenik et al. 2021). Aus der in **Abbildung 3** gezeigten Struktur des Komplexes zwischen der Cysteinprotease Papain und CSTB geht hervor, dass CSTB wie ein Keil in der katalytisch aktiven Domäne der Protease sitzt. Allerdings wird vermutet, dass die Cystatine dabei nicht gespalten werden (Tusar, Usenik et al. 2021). Die Abnahme von CSTB wird in meinen Daten in der hyperaktiven CTSS^{Y132D} Mutante oder nach LMP besonders deutlich. Die strukturellen Veränderungen von CTSS^{Y132D} könnten beispielsweise dazu führen, dass CSTB in eine Position gelangt, bei der eine Spaltung möglich ist. Außerdem könnten nach LMP auch andere Proteine, die möglicherweise CSTB prozessieren, freigesetzt werden.

5.5.2 Auswirkungen auf den Zelltod

Lymphome mit Ursprung im GC zeichnen sich besonders durch die Bedeutung der anti-apoptotischen Proteine, wie z.B. MCL1 und BCL2, aus (McDonnell, Deane et al. 1989, Fernández-Marrero, Spinner et al. 2016). Wir beobachten, dass alle untersuchten B-NHL Zelllinien nach LLOMe Behandlung in den Zelltod übergehen. Mit meinen Western Blots konnte ich die Spaltung der zytosolischen Proteine MCL1 und BID sowie die Abnahme von BCL2 in Karpas422 Zellen zeigen, was nach Induktion von LMP nochmals verstärkt wurde. Im Falle des CSTB k/d reichten bereits 10-fach niedrigere LLOMe Konzentrationen aus, um die Effekte im Western Blot zu sehen (10 µM anstelle von 100 µM). Frühere Studien in MCF-7 Brustkrebszelllinien bestätigen, dass CTSS MCL1, BCL2 und BID spalten kann (Droga-Mazovec, Bojic et al. 2008).

Das ist vereinbar mit unserem Modell, dass B-NHLs mit CTSS-Hyperaktivität nach Freisetzung von CTSS (und anderen Cystein Proteasen) den Zelltod einleiten. Das geschieht vor allem dann, wenn die Level von CSTB im Zytosol niedrig sind (**Abbildung 24**). Ich schlussfolgere daraus, dass die CTSS Aktivität im Lysosom und im Zytosol klinisch relevant sein kann und die CTSS Aktivität von einem komplexen Netzwerk kontrolliert wird. Beim FL scheint v.a. CSTB funktionell relevant zu sein. Die Messung der Netto-**Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom**

Cathepsin-Aktivität im Zytosol muss die relevanten Komponenten berücksichtigen. Das ist eine Herausforderung, die es auch im Hinblick auf LMP-induzierende Therapien zu bewältigen gilt.

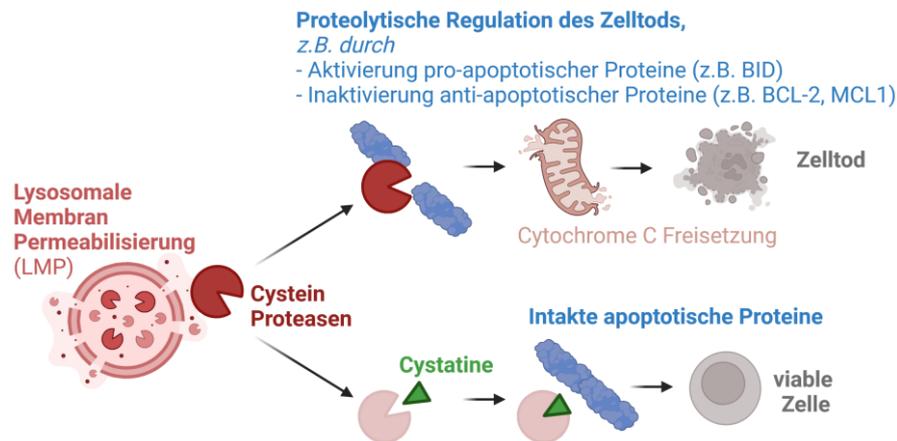


Abbildung 24 Modell des Lysosom-vermittelten Zelltods in B-NHL (basierend auf des in Abbildung 23 gezeigten Western Blot).

Oben: Die Freisetzung der Cathepsine (in Rot) kann die pro- und antiapoptotische Proteine regulieren und somit den Apoptose einleiten. Unten: Die endogenen Cathepsin-Inhibitoren/Cystatine inhibieren die Cathepsine im Zytosol und sind somit ein wichtiger Faktor der Cathepsinaktivität in B-NHLs.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten der molekulare Mechanismus der CTSS^{Y132}-Mutationen in FL, die Auswirkungen auf das TME, das Therapieansprechen von Patienten mit CTSS-Hyperaktivität, sowie die Regulation von zytosolischem CTSS untersucht werden. Weitere Experimente könnten dazu beitragen, die Auswirkungen der CTSS-Hyperaktivität in FL, weiteren hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankungen zu entschlüsseln. Es bleiben offene Fragen bei (i) den zellintrinsic Auswirkungen der CTSS-Hyperaktivität unter Berücksichtigung von CSTB, (ii) der genauen Interaktion CTSS-hyperaktiver FL mit dem TME, sowie (iii) beim therapeutischen Potential der CTSS-Hyperaktivität. Meine diskutierten Ergebnisse, sowie weitere präliminäre Daten des Labors zeigen besonders die Relevanz dieser drei Punkte auf.

5.6.1 Identifizierung des Interaktoms von CTSS durch Markierung proximaler Proteine mittels Bio-ID2

Da CTSS eine sehr promiskuitive Cysteinprotease ist, könnten die Folgen aberranter CTSS-Aktivität vielfältig sein. Die vorher beschriebene Co-IP bildet dabei nur

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Interaktionspartner von CTSS ab, die direkt an CTSS binden. Daher habe ich angefangen, das Interaktom von CTSS umfassender zu untersuchen.

Dazu habe ich zuerst ein Fusionsprotein, bestehend aus pro-CTSS in voller Länge (CTSS^{WT} oder CTSS^{Y132D}) und BioID2 in Karpas422 CTSS^{KO} und DG75 CTSS^{KO} Zellen exprimiert. BioID2 ist eine promiskuitiven Biotinligase der zweiten Generation, die Proteine innerhalb von ~10-20 nm biotinyliert (Kim, Jensen et al. 2016) (Schematische Struktur des Fusionskonstrukts in **Abbildung 25A**). Da CTSS selbst in der Lage war BioID2 abzuspalten (**Abbildung 25B**), habe ich zusätzlich eine CTSS^{C139A}-Mutation eingeführt, die CTSS enzymatisch inaktiv macht. Der Western Blot bestätigte die Expression des Fusionskonstrukts, einschließlich der erhöhten Spaltung von BioID2_pro-CTSS^{Y132D} und der Aufhebung der Spaltung mit der zusätzlichen CTSS^{C139A}-Mutation (**Abbildung 25B**). Die Messung der *in vitro* Substratspalteaktivität zeigte, dass die BioID2-Fusion die enzymatische Aktivität von CTSS nicht beeinträchtigte und dass die CTSS^{Y132D}-Mutation die Aktivität noch erhöhte, während die CTSS^{C139A}-Mutation CTSS enzymatisch inaktivierte (**Abbildung 25C**).

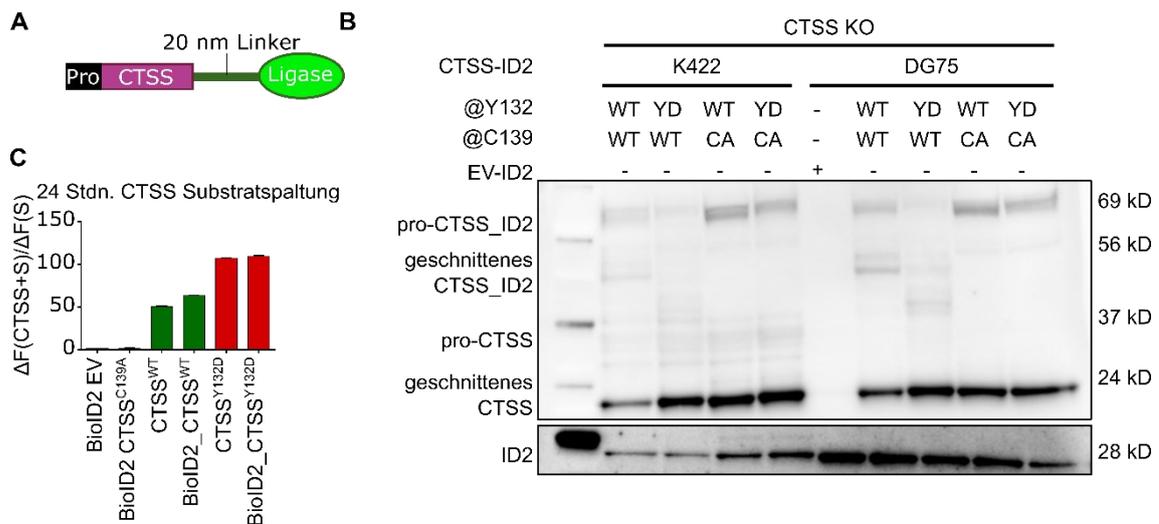


Abbildung 25 Expression und Aktivitätsmessung des BioID2-CTSS-Fusionsproteins.

A) Schematische Struktur des Expressionsvektors. **B)** Western Blot für CTSS und BioID2 (ID2) von Karpas422 CTSS^{KO} Zellen die pro-CTSS, fusioniert mit BioID2, exprimieren. **C)** *In vitro* CTSS-Substratspaltungsaktivität (Z-VVR-AFC-Substrat) von immunpräzipitiertem CTSS aus Karpas422-CTSS^{KO} Zellen, die die angegebenen Konstrukte exprimieren; $\Delta F(\text{CTSS+S})/\Delta F(\text{S})$ ist die Substratspalteaktivität im Vergleich zum AFC-Signal ohne Enzym. YD = CTSS^{Y132D}, WT = CTSS^{WT}, CA = CTSS^{C139A}.

Als nächstes wurden biotinylierte Proteine in CTSS-BioID2-exprimierenden Zellen aufgereinigt und mit Proteinen aus Kontrollzellen (die EV exprimieren) durch SILAC-basierte quantitative Massenspektrometrie (MS) verglichen. Die Daten wurden zunächst, anhand öffentlich zugänglicher Datensätze, streng auf Hintergrundrauschen gefiltert (**Abbildung 26**).

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Die identifizierten Proteine wurden anschließend Kategorien, wie Zellkern (z.B. Nukleoporine (NUPs), RANBP1, RANGEP1), Transkriptionsregulation (z.B. EBF1, EIF2B3, TAF4, TAF6 und der CCR4-NOT-Komplex), Proteinbindung (z.B. CHCHD6), Antigenprozessierung und -präsentation (z.B. CD74- und MHC-II-Gene), und NF- κ B-Signalübertragung (z.B. TLR9 und CARD11), zugeordnet (**Abbildung 26A** und **Tabelle 2**) und bilden somit den Ausgangspunkt für die Definition des funktionell relevanten CTSS-Interaktoms in Lymphomen.

5.6.2 Auswirkungen von CTSS im Zellkern

Meine vorläufigen Ergebnisse bestätigen anerkannte Rollen von CTSS in Signalwegen wie Antigenverarbeitung und -präsentation, Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalisierung und NF κ B-Signalisierung. Bemerkenswerterweise deuten unsere Ergebnisse auch auf bisher weitestgehend unbekannte Aktivitäten von CTSS innerhalb des Zellkerns hin, wie z. B. die Transkriptionsregulation. Nukleäre Proteine tauchten wiederum auch in den Co-IP Daten auf (**Abbildung 18**), was ein deutlicher Hinweis auf die Relevanz von CTSS im Nukleus ist. Mittels IF-Mikroskopie und Western Blot konnte ich signifikante Mengen von aktivem CTSS im Zellkern nachweisen (**Abbildung 26B+C**). Die Mechanismen für die nukleare Lokalisierung von Cystein-Cathepsinen in B-NHLs sind noch nicht bekannt, es besteht allerdings die Möglichkeit, dass Cathepsine andere Proteine binden, die einen Transport in den Nukleus ermöglichen (Tedelind, Poliakova et al. 2010). Analyse der Kernlokalisierungssignale (NLS) zeigt neben CTSB, CTSC, CTSK und CTSL auch bei CTSS eine AS-Sequenz mit einem cNLS Mapper Score >5, was auf eine moderate NLS hindeutet (**Abbildung 26D**). Mithilfe der NLS und NUPs können Proteine in den Zellkern transportiert werden (Beck and Hurt 2016) und ich konnte zwei NUPs des inneren Rings des Kernporenkomplexes im Interaktom von CTSS identifizieren (NUP205 und NUP62, aus Tabelle 2).

Einmal im Nukleus angekommen, könnte aktives CTSS eine Vielzahl an Substraten spalten.

Die Rolle von Cathepsinen bei der Spaltung von Transkriptionsfaktoren (TF) im Nukleus wurde bereits mehrfach beschrieben (Goulet, Truscott et al. 2006, Ceru, Konjar et al. 2010, Tedelind, Poliakova et al. 2010, Bach, Derocq et al. 2015, Tamhane, Llukumbura et al. 2016, Burton, Henderson et al. 2017). Beispielweise schneidet nukleares Cathepsin L den Transkriptionsfaktor CUX1 und beschleunigt somit den Zellzyklus in Darmkrebszellen (Tamhane, Llukumbura et al. 2016). Außerdem kann nukleares Cathepsin L den N-Terminus von Histon H3 prozessieren und somit die Genexpression regulieren (Duncan, Muratore-Schroeder et al. 2008, Santos-Rosa, Kirmizis et al. 2009). Nukleares

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Cathepsin D verstärkt die Funktion des Transkriptionsrepressors TRPS1, der für die Zellzyklusregulation und Transformation menschlichen Brustkrebszellen verantwortlich ist (Bach, Derocq et al. 2015). Nukleares CTSS wurde bereits bei Brustkrebs zur Regulation der BRCA1-Stabilität nachgewiesen (Kim, Jin et al. 2019), aber noch nicht bei Lymphomen.

Um funktionell relevante Substrate in meinen B-NHL Zelllinien zu untersuchen, habe ich die BioID2-Daten für TF gefiltert (**Abbildung 26E**). Ein einziger TF, CHCHD3, wurde überlappend in beiden Zelllinien identifiziert. Allerdings, ist über CHCHD3 wenig bekannt und wurde deswegen zunächst nicht priorisiert. Daher habe ich weitere TF auf deren Prozessierung durch CTSS untersucht, angefangen mit BCL6, einer der Hauptregulatoren des GC (Basso and Dalla-Favera 2010). Interessanterweise ist eine deutliche CTSS-abhängige Spaltung von BCL6 im Zellkern im Western Blot von DG75 und Karpas422 Zellen zu sehen (**Abbildung 26F**).

Die vorhergesagten Spaltungsstellen von CTSS in BCL6 passen gut zur Größe der geschnittenen BCL6 Fragmente (Top 3 vorhergesagte Prozessierungsprodukte: i) N-Terminus: 439 AS/48 kD, C-Terminus: 278 AS/31 kD, ii) N-Terminus: 286 AS/32 kD, C-Terminus: 431 AS/47 kD, und iii) N-Terminus: 172 AS/19 kD, C-Terminus: 545 AS/59 kD).

Allerdings ist aktuell unklar, ob das ein relevanter Phänotyp in primären Patientenproben ist oder nur ein Phänomen in unseren Zelllinien. In meinen Modellzelllinien wäre es sogar möglich, dass die Spaltung von BCL6, ähnlich wie die niedrigeren BCL2 Level in Zellen mit CTSS-Hyperaktivität, kaum zellintrinsische Auswirkungen hat und könnte durch die Freisetzung von CTSS in das Zytosol und ggf. weitere Translokation in den Nukleus über die NUPs geschuldet sein.

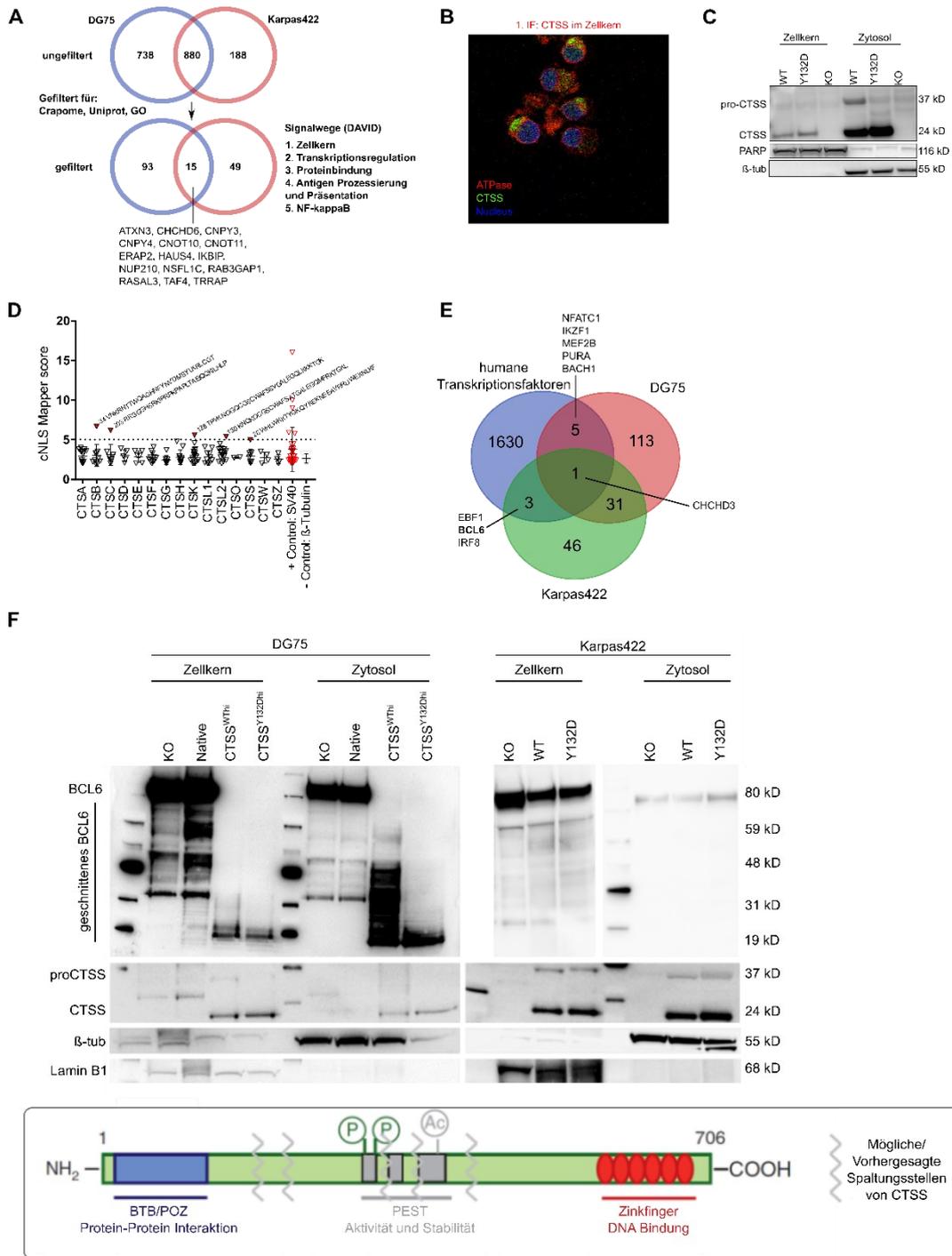


Abbildung 26 Identifizierung von nuklearem CTSS in B-NHLs.

A) Identifizierte biotinylierte Proteine in DG75- und Karpas422-CTSS^{KO} Zellen, die CTSS-BioID2 exprimieren, im Vergleich zu mit EV-Kontrolle. Details zu den angewendeten Filtern sind den Methoden zu entnehmen. Eine Übersicht aller identifizierter Proteine ist in Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. dargestellt. **B)** Konfokales Immunofluoreszenzbild gefärbt für die Plasmamembran (ATPase), CTSS und dem Nucleus (DAPI). **C)** Western Blot von subzellulären Fraktionen von Karpas422 Zellen mit den angegebenen Genotypen. **D)** Analyse der Kernlokalisierungssignale (NLS) mit cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>, aufgerufen am 18.01.2021) für die AS-Sequenzen aller Cathepsine. Die SV40 Sequenz diente als Positivkontrolle, β -Tubulin als Negativkontrolle für NLS. **E)** Venn-Diagramm aller identifizierten Transkriptionsfaktoren aus den Daten von A). **F)** Oben: Western Blot für BCL6, unten: Struktur von BCL6

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

mit Markierung der vorhergesagten Spaltungsstellen von CTSS (grau) berechnet mit dem PAC-MAN tool (<https://platt.gatech.edu/PACMANS>, aufgerufen am 16.02.2021).

Weitere Studien sind nötig, um das zu untersuchen und um aufzudecken, ob die CTSS-bedingte BCL6 Spaltung in B-NHLs eine funktionelle Auswirkung hat. Im Mausmodell von (Dheilly, Battistello et al. 2020) zeigt sich eine Expansion des GC und Akkumulation von BCL6⁺ Zellen in CTSS-hyperaktiven Tumoren, und keine Entwicklung der GC bei Tumoren von Ctss^{KO} Mäusen, was in zumindest in diesem Modell eine BCL6 Inaktivierung unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Für eine definitive Aussage sollten aber zuerst primäre Patientenproben auf BCL6-Spaltung untersucht werden.

Generell lassen sich aus den BioID2-Daten eine Menge interessanter teils bekannter, teils neuer, möglicher Substrate von CTSS ablesen. Dennoch muss jedes Substrat im zellulären Kontext, und der tatsächlichen Aktivität von CTSS nach Abzügen der Cystatin-Effekte für sich analysiert werden (wie erwartet konnte auch CSTB im CTSS-Interaktom mit BioID2 identifiziert werden – Tabelle 2).

5.6.3 Ausnutzung therapeutischer Schwachstellen CTSS-hyperaktiver Tumore

Ein besseres biologisches Verständnis der Interaktionen zwischen Lymphomzellen und dem TME des Immunsystems verspricht neue Wege für gezielte Therapien, wie die klinische Aktivität von immunmodulierenden Medikamenten (IMiDs, z. B. Lenalidomid) und hemmenden Antikörpern gegen Immun-Checkpoint-Moleküle auf Tumorzellen (z. B. PD-L1), T Zellen (z. B. PD1) oder Makrophagen (z. B. CD47) zeigt (Chao, Alizadeh et al. 2010, Song, Park et al. 2019, Bednarska, Nath et al. 2021). Der spezifische zelluläre Crosstalk, der das TME-vermittelte Fortschreiten von CTSS-hyperaktiven Lymphomen antreibt, und sein Nutzen als therapeutisches Ziel müssen jedoch noch ermittelt werden.

Meine Arbeit liefert die Grundlage für künftige Studien, um zu prüfen, ob die CTSS-Hyperaktivität als prädiktiver Marker für Ansprechen auf immunmodulierende Therapien verwendet werden kann.

Meine Daten legen nahe, dass auf der einen Seite die Entwicklung spezifischer Cathepsin-Inhibitoren und auf der anderen Seite die Entwicklung / Wiederverwendung LMP-induzierender compounds einen therapeutischen Nutzen in CTSS-hyperaktiven Krebserkrankungen haben können. Leider weisen selbst die niedermolekularen Cathepsin-Inhibitoren, wie Petesicatib, eine hohe Cross-Reaktivität bei mehreren Proteasen auf und die Nebenwirkungen begrenzen deren klinische Anwendung (Hargreaves,

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

Daoudlarian et al. 2019). Um die Nachteile der verfügbaren Cathepsininhibitoren zu eliminieren, könnten diese an Antikörper gekoppelt werden, und diese Antikörper-Drug-Konjugate (ADCs) schließlich durch Endozytose auf natürlichem Wege im Lysosom landen (Hammood, Craig et al. 2021). Modernere Ansätze, wie z.B. PROTACs, könnten dazu beitragen auch weitaus spezifischere Cathepsininhibitoren zu entwickeln (An and Fu 2018). Bemerkenswerterweise gibt es bereits PROTACs, die durch Cathepsin B erst im Tumor aktiviert werden sollen (Zhang, Zeng et al. 2021).

Auf der anderen Seite zeigen meine Daten, dass eine hohe zytosolische Cathepsinaktivität den Zelltod auslösen oder verstärken kann. Zukünftige compound-screens könnten durchgeführt werden, um LMP-induzierende Substanzen zu identifizieren, die eine niedrigere IC50 als LLOMe haben, mit dem Ziel Cathepsin-hyperaktive Tumorzellen in Zukunft gezielt abtöten zu können.

Literaturverzeichnis

Abrahamson, M., A. J. Barrett, G. Salvesen and A. Grubb (1986). "Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids." *J Biol Chem* **261**(24): 11282-11289.

Aguzzi, A., J. Kranich and N. J. Krautler (2014). "Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease." *Trends Immunol* **35**(3): 105-113.

Alaggio, R., C. Amador, I. Anagnostopoulos, A. D. Attygalle, I. B. d. O. Araujo, E. Berti, G. Bhagat, A. M. Borges, D. Boyer, M. Calaminici, A. Chadburn, J. K. C. Chan, W. Cheuk, W.-J. Chng, J. K. Choi, S.-S. Chuang, S. E. Coupland, M. Czader, S. S. Dave, D. de Jong, M.-Q. Du, K. S. Elenitoba-Johnson, J. Ferry, J. Geyer, D. Gratzinger, J. Guitart, S. Gujral, M. Harris, C. J. Harrison, S. Hartmann, A. Hochhaus, P. M. Jansen, K. Karube, W. Kempf, J. Khoury, H. Kimura, W. Klapper, A. E. Kovach, S. Kumar, A. J. Lazar, S. Lazzi, L. Leoncini, N. Leung, V. Leventaki, X.-Q. Li, M. S. Lim, W.-P. Liu, A. Louissaint, A. Marcogliese, L. J. Medeiros, M. Michal, R. N. Miranda, C. Mitteldorf, S. Montes-Moreno, W. Morice, V. Nardi, K. N. Naresh, Y. Natkunam, S.-B. Ng, I. Oshlies, G. Ott, M. Parrens, M. Pulitzer, S. V. Rajkumar, A. C. Rawstron, K. Rech, A. Rosenwald, J. Said, C. Sarkozy, S. Sayed, C. Saygin, A. Schuh, W. Sewell, R. Siebert, A. R. Sohani, R. Tooze, A. Traverse-Glehen, F. Vega, B. Vergier, A. D. Wechalekar, B. Wood, L. Xerri and W. Xiao (2022). "The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms." *Leukemia* **36**(7): 1720-1748.

Alduaj, W., A. Ivanov, J. Honeychurch, E. J. Cheadle, S. Potluri, S. H. Lim, K. Shimada, C. H. Chan, A. Tutt, S. A. Beers, M. J. Glennie, M. S. Cragg and T. M. Illidge (2011). "Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies." *Blood* **117**(17): 4519-4529.

Alexandrov, L. B., S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjord, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilicic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jager, D. T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. Lopez-Otin, 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. Tutt, R. Valdes-Mas, M. M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, I. B. C. Consortium, I. M.-S. Consortium, I. PedBrain, 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 (2013). "Signatures of mutational processes in human cancer." *Nature* **500**(7463): 415-421.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-738.

An, S. and L. Fu (2018). "Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs." *EBioMedicine* **36**: 553-562.

Andor, N., E. F. Simonds, D. K. Czerwinski, J. Chen, S. M. Grimes, C. Wood-Bouwens, G. X. Y. Zheng, M. A. Kubit, S. Greer, W. A. Weiss, R. Levy and H. P. Ji (2019). "Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints." *Blood* **133**(10): 1119-1129.

Attaf, N., S. Baaklini, L. Binet and P. Milpied (2021). "Heterogeneity of germinal center B cells: New insights from single-cell studies." *European Journal of Immunology* **51**(11): 2555-2567.

Bach, A. S., D. Derocq, V. Laurent-Matha, P. Montcourrier, S. Sebti, B. Orsetti, C. Theillet, C. Gongora, S. Patingre, E. Ibing, P. Roger, L. K. Linares, T. Reinheckel, G. Meurice, F. J. Kaiser, C. Gespach and E. Liudet-Coopman (2015). "Nuclear cathepsin D enhances TRPS1 transcriptional repressor function to regulate cell cycle progression and transformation in human breast cancer cells." *Oncotarget* **6**(29): 28084-28103.

Bararia, D., J. A. Hildebrand, S. Stolz, S. Haebe, S. Alig, C. P. Trevisani, F. Osorio-Barrrios, M. D. Bartoschek, M. Mentz, A. Pastore, E. Gaitzsch, M. Heide, V. Jurinovic, K. Rautter, J.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Gunawardana, M. B. Sabdia, M. Szczepanowski, J. Richter, W. Klapper, A. Louissaint, Jr., C. Ludwig, S. Bultmann, H. Leonhardt, S. Eustermann, K. P. Hopfner, W. Hiddemann, M. von Bergwelt-Baildon, C. Steidl, R. Kridel, J. W. D. Tobin, M. K. Gandhi, D. M. Weinstock, M. Schmidt-Suppran, M. B. Sarosi, M. Rudelius, V. Passerini, J. Mautner and O. Weigert (2020). "Cathepsin S Alterations Induce a Tumor-Promoting Immune Microenvironment in Follicular Lymphoma." Cell Rep **31**(5): 107522.
- Bararia, D., H. S. Kwok, R. S. Welner, A. Numata, M. B. Sarosi, H. Yang, S. Wee, S. Tschuri, D. Ray, O. Weigert, E. Levantini, A. K. Ebralidze, J. Gunaratne and D. G. Tenen (2016). "Acetylation of C/EBPalpha inhibits its granulopoietic function." Nat Commun **7**: 10968.
- Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath and F. R. Carbone (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements." Immunol Cell Biol **76**(1): 34-40.
- Basso, K. and R. Dalla-Favera (2010). "BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis." Adv Immunol **105**: 193-210.
- Beck, M. and E. Hurt (2016). "The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight." Nature Reviews Molecular Cell Biology **18**.
- Bednarska, K., K. Nath, W. Nicol and M. K. Gandhi (2021). "Immunity reloaded: Deconstruction of the PD-1 axis in B cell lymphomas." Blood Reviews **50**: 100832.
- Beers, C., K. Honey, S. Fink, K. Forbush and A. Rudensky (2003). "Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages." J Exp Med **197**(2): 169-179.
- Binnewies, M., E. W. Roberts, K. Kersten, V. Chan, D. F. Fearon, M. Merad, L. M. Coussens, D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, C. C. Hedrick, R. H. Vonderheide, M. J. Pittet, R. K. Jain, W. Zou, T. K. Howcroft, E. C. Woodhouse, R. A. Weinberg and M. F. Krummel (2018). "Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy." Nat Med **24**(5): 541-550.
- Bonnans, C., J. Chou and Z. Werb (2014). "Remodelling the extracellular matrix in development and disease." Nature Reviews Molecular Cell Biology **15**(12): 786-801.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin **68**(6): 394-424.
- Buck, M. R., D. G. Karustis, N. A. Day, K. V. Honn and B. F. Sloane (1992). "Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues." Biochem J **282** (Pt 1): 273-278.
- Buller, A. R. and C. A. Townsend (2013). "Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(8): E653-661.
- Burton, L. J., V. Henderson, L. Liburd and V. A. Odero-Marah (2017). "Snail transcription factor NLS and importin beta1 regulate the subcellular localization of Cathepsin L and Cux1." Biochem Biophys Res Commun **491**(1): 59-64.
- Butinar, M., M. T. Prebanda, J. Rajković, B. Jerič, V. Stoka, C. Peters, T. Reinheckel, A. Krüger, V. Turk, B. Turk and O. Vasiljeva (2014). "Stefin B deficiency reduces tumor growth via sensitization of tumor cells to oxidative stress in a breast cancer model." Oncogene **33**(26): 3392-3400.
- Carmona, E., E. Dufour, C. Plouffe, S. Takebe, P. Mason, J. S. Mort and R. Menard (1996). "Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases." Biochemistry **35**(25): 8149-8157.
- Carter, S. L., K. Cibulskis, E. Helman, A. McKenna, H. Shen, T. Zack, P. W. Laird, R. C. Onofrio, W. Winckler, B. A. Weir, R. Beroukhim, D. Pellman, D. A. Levine, E. S. Lander, M. Meyerson and G. Getz (2012). "Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer." Nat Biotechnol **30**(5): 413-421.

- Casulo, C., 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 (2015). "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." *J Clin Oncol* **33**(23): 2516-2522.
- Ceru, S., S. Konjar, K. Maher, U. Repnik, I. Krizaj, M. Bencina, M. Renko, A. Nepveu, E. Zerovnik, B. Turk and N. Kopitar-Jerala (2010). "Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus." *J Biol Chem* **285**(13): 10078-10086.
- Chao, M. P., A. A. Alizadeh, C. Tang, J. H. Myklebust, B. Varghese, S. Gill, M. Jan, A. C. Cha, C. K. Chan, B. T. Tan, C. Y. Park, F. Zhao, H. E. Kohrt, R. Malumbres, J. Briones, R. D. Gascoyne, I. S. Lossos, R. Levy, I. L. Weissman and R. Majeti (2010). "Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma." *Cell* **142**(5): 699-713.
- Chockalingam, A., J. L. Cameron, J. C. Brooks and C. A. Leifer (2011). "Negative regulation of signaling by a soluble form of toll-like receptor 9." *Eur J Immunol* **41**(8): 2176-2184.
- Conticello, S. G. (2008). "The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators." *Genome Biol* **9**(6): 229.
- Coulombe, R., P. Grochulski, J. Sivaraman, R. Menard, J. S. Mort and M. Cygler (1996). "Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment." *EMBO J* **15**(20): 5492-5503.
- Cox, J. L. (2009). "Cystatins and cancer." *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**(2): 463-474.
- Dave, S. S. (2008). "Follicular lymphoma and the microenvironment." *Blood* **111**(9): 4427-4428.
- Dave, S. S., 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 (2004). "Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells." *N Engl J Med* **351**(21): 2159-2169.
- Dheilly, E., E. Battistello, N. Katanayeva, S. Sungalee, J. Michaux, G. Duns, S. Wehrle, J. Sordet-Dessimoz, M. Mina, J. Racle, P. Farinha, G. Coukos, D. Gfeller, A. Mottok, R. Kridel, B. E. Correia, C. Steidl, M. Bassani-Sternberg, G. Ciriello, V. Zoete and E. Oricchio (2020). "Cathepsin S Regulates Antigen Processing and T Cell Activity in Non-Hodgkin Lymphoma." *Cancer Cell* **37**(5): 674-689 e612.
- Di Noia, J. M. and M. S. Neuberger (2007). "Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation." *Annu Rev Biochem* **76**: 1-22.
- Dickinson, D. P. (2002). "Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease." *Crit Rev Oral Biol Med* **13**(3): 238-275.
- Droga-Mazovec, G., L. Bojic, A. Petelin, S. Ivanova, R. Romih, U. Repnik, G. S. Salvesen, V. Stoka, V. Turk and B. Turk (2008). "Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues." *J Biol Chem* **283**(27): 19140-19150.
- Dunbrack, R. L., Jr. (2002). "Rotamer libraries in the 21st century." *Curr Opin Struct Biol* **12**(4): 431-440.
- Duncan, E. M., T. L. Muratore-Schroeder, R. G. Cook, B. A. Garcia, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and C. D. Allis (2008). "Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation." *Cell* **135**(2): 284-294.
- Erez, E., D. Fass and E. Bibi (2009). "How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane." *Nature* **459**(7245): 371-378.

Ewald, S. E., B. L. Lee, L. Lau, K. E. Wickliffe, G. P. Shi, H. A. Chapman and G. M. Barton (2008). "The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor." *Nature* **456**(7222): 658-662.

Fehn Dr. med., M. (2001). funktionelle Bedeutung hochkonservierter Aminosäurereste in der Prodomäne von Cathepsin S.

Fernández-Marrero, Y., S. Spinner, T. Kaufmann and P. J. Jost (2016). "Survival control of malignant lymphocytes by anti-apoptotic MCL-1." *Leukemia* **30**(11): 2152-2159.

Fiebiger, B. M., A. Moosmann, U. Behrends and J. Mautner (2012). "Mature proteins derived from Epstein-Barr virus fail to feed into the MHC class I antigenic pool." *Eur J Immunol* **42**(12): 3167-3173.

Fonović, M. and B. Turk (2014). "Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation." *Biochim Biophys Acta* **1840**(8): 2560-2570.

Fox, T., E. de Miguel, J. S. Mort and A. C. Storer (1992). "Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide." *Biochemistry* **31**(50): 12571-12576.

G, B. A. a. S. (1986). "Proteinase Inhibitors." *Elsevier*.

Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. M. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.-M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. García-Sáez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J.-C. Marine, S. J. Martin, J.-C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenkin, U. M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H.-U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino and G. Kroemer (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death & Differentiation* **25**(3): 486-541.

Gao, J., B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander and N. Schultz (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal." *Sci Signal* **6**(269): p11.

Gascoyne, R. D., 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 (2017). "Follicular lymphoma: State-of-the-art ICML workshop in Lugano 2015." *Hematol Oncol* **35**(4): 397-407.

Glas, A. M., L. Knoops, L. Delahaye, M. J. Kersten, R. E. Kibbelaar, L. A. Wessels, R. van Laar, J. H. van Krieken, J. W. Baars, J. Raemaekers, P. M. Kluin, L. J. van't Veer and D. de Jong (2007). "Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma." *J Clin Oncol* **25**(4): 390-398.

Goto, T., T. Yamaza and T. Tanaka (2003). "Cathepsins in the osteoclast." *Journal of Electron Microscopy* **52**(6): 551-558.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Gotz, A. W., M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand and R. C. Walker (2012). "Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born." *J Chem Theory Comput* **8**(5): 1542-1555.
- Goulet, B., M. Truscott and A. Nepveu (2006). "A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L." *Biol Chem* **387**(9): 1285-1293.
- Groth-Pedersen, L., M. S. Ostensfeld, M. Hoyer-Hansen, J. Nylandsted and M. Jaattela (2007). "Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine." *Cancer Res* **67**(5): 2217-2225.
- Haebe, S., T. Shree, A. Sathe, G. Day, D. K. Czerwinski, S. M. Grimes, H. Lee, M. S. Binkley, S. R. Long, B. Martin, H. P. Ji and R. Levy (2021). "Single-cell analysis can define distinct evolution of tumor sites in follicular lymphoma." *Blood* **137**(21): 2869-2880.
- Haka, A. S., I. Grosheva, E. Chiang, A. R. Buxbaum, B. A. Baird, L. M. Pierini and F. R. Maxfield (2009). "Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins." *Mol Biol Cell* **20**(23): 4932-4940.
- Halaby, R. (2021). "Natural Products Induce Lysosomal Membrane Permeabilization as an Anticancer Strategy." *Medicines* **8**(11): 69.
- Hämälistö, S., J. Stahl, E. Favaro, Q. Yang, B. Liu, L. Christoffersen, B. Loos, C. Boldú, J. Joyce, T. Reinheckel, M. Barisic and M. Jaattela (2020). "Spatially and temporally defined lysosomal leakage facilitates mitotic chromosome segregation." *Nature Communications* **11**: 229.
- Hammood, M., A. W. Craig and J. V. Leyton (2021). "Impact of Endocytosis Mechanisms for the Receptors Targeted by the Currently Approved Antibody-Drug Conjugates (ADCs)—A Necessity for Future ADC Research and Development." *Pharmaceuticals* **14**(7): 674.
- Hammouda, N. E., M. A. Salah El-Din, M. M. El-Shishtawy and A. M. El-Gayar (2017). "Serum Cystatin C as a Biomarker in Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *Sci Pharm* **85**(1).
- Hanahan, D. (2022). "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." *Cancer Discov* **12**(1): 31-46.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hargreaves, P., D. Daoudlarian, M. Theron, F. A. Kolb, M. Manchester Young, B. Reis, A. Tiaden, B. Bannert, D. Kyburz and T. Manigold (2019). "Differential effects of specific cathepsin S inhibition in biocompartments from patients with primary Sjögren syndrome." *Arthritis Res Ther* **21**(1): 175.
- Harvard, T. B. I. o. M. (2018). "CTSS." Retrieved 04.06.2018, 2018, from <https://portals.broadinstitute.org/ccle/page?gene=CTSS>.
- Haves-Zburof, D., T. Paperna, A. Gour-Lavie, I. Mandel, L. Glass-Marmor and A. Miller (2011). "Cathepsins and their endogenous inhibitors cystatins: expression and modulation in multiple sclerosis." *J Cell Mol Med* **15**(11): 2421-2429.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill and A. Aderem (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-1103.
- He, S., L. H. Wang, Y. Liu, Y. Q. Li, H. T. Chen, J. H. Xu, W. Peng, G. W. Lin, P. P. Wei, B. Li, X. Xia, D. Wang, J. X. Bei, X. He and Z. Guo (2020). "Single-cell transcriptome profiling of an adult human cell atlas of 15 major organs." *Genome Biol* **21**(1): 294.
- Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-1529.
- Hellmuth, J. C., A. Louissaint, Jr., M. Szczepanowski, S. Haebe, A. Pastore, S. Alig, A. M. Staiger, S. Hartmann, R. Kridel, M. D. Ducar, P. Koch, M. Dreyling, M. L. Hansmann, G. Ott, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, D. M. Weinstock, W. Hiddemann, W. Klapper and O. Weigert (2018). "Duodenal-type and nodal follicular lymphomas differ by their immune microenvironment rather than their mutation profiles." *Blood* **132**(16): 1695-1702.

- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-745.
- Hildebrand, J. (2018). Deciphering the Molecular Gain-of-Function Mechanism of Cathepsin S Mutations in Follicular Lymphoma Master thesis.
- Hobeika, E., S. Thiemann, B. Storch, H. Jumaa, P. J. Nielsen, R. Pelanda and M. Reth (2006). "Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(37): 13789-13794.
- Honey, K. and A. Y. Rudensky (2003). "Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation." *Nat Rev Immunol* **3**(6): 472-482.
- Honjo, T., H. Nagaoka, R. Shinkura and M. Muramatsu (2005). "AID to overcome the limitations of genomic information." *Nat Immunol* **6**(7): 655-661.
- Huet, S., B. Tesson, J. P. Jais, A. L. Feldman, L. Magnano, E. Thomas, A. Traverse-Glehen, B. Albaud, M. Carrere, L. Xerri, S. M. Ansell, L. Baseggio, C. Reyes, K. Tarte, S. Boyault, C. Haioun, B. K. Link, P. Feugier, A. Lopez-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 (2018). "A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts." *Lancet Oncol* **19**(4): 549-561.
- Ishidoh, K. and E. Kominami (1995). "Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **217**(2): 624-631.
- Izadi, S. and A. V. Onufriev (2016). "Accuracy limit of rigid 3-point water models." *J Chem Phys* **145**(7): 074501.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Johnson, P. W. M., S. M. Watt, D. R. Betts, D. Davies, S. Jordan, A. J. Norton and T. A. Lister (1993). "Isolated Follicular Lymphoma Cells Are Resistant to Apoptosis and Can Be Grown In Vitro in the CD40/Stromal Cell System." *Blood* **82**(6): 1848-1857.
- Jurinovic, V., R. Kridel, A. M. Staiger, M. Szczepanowski, H. Horn, M. H. Dreyling, A. Rosenwald, G. Ott, W. Klapper, A. D. Zelenetz, P. M. Barr, J. W. Friedberg, S. Ansell, L. H. Sehn, J. M. Connors, R. D. Gascoyne, W. Hiddemann, M. Unterhalt, D. M. Weinstock and O. Weigert (2016). "Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy." *Blood* **128**(8): 1112-1120.
- Karttunen, T., M. Apaja-Sarkkinen, M. Alavaikko, G. Blanco, R. Aine, M. Järvinen and H. Autio-Harmainen (1988). "Characterization of extracellular matrix in non-Hodgkin's lymphomas." *Pathol Res Pract* **183**(6): 735-746.
- Kaulmann, G., G. J. Palm, K. Schilling, R. Hilgenfeld and B. Wiederanders (2006). "The crystal structure of a Cys25 -> Ala mutant of human procathepsin S elucidates enzyme-prosequence interactions." *Protein Sci* **15**(11): 2619-2629.
- Kazanietz, M. G., M. Durando and M. Cooke (2019). "CXCL13 and Its Receptor CXCR5 in Cancer: Inflammation, Immune Response, and Beyond." *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**: 471.
- Kenneth M. Murphy, P. T., Mark Walport (2009). Janeway Immunologie.
- Ketterer, S., A. Gomez-Auli, L. E. Hillebrand, A. Petrera, A. Ketscher and T. Reinheckel (2017). "Inherited diseases caused by mutations in cathepsin protease genes." *Febs j* **284**(10): 1437-1454.
- Kiaii, S., A. J. Clear, A. G. Ramsay, D. Davies, A. Sangaralingam, A. Lee, M. Calaminici, D. S. Neuberg and J. G. Gribben (2013). "Follicular lymphoma cells induce changes in T-cell gene expression and function: potential impact on survival and risk of transformation." *J Clin Oncol* **31**(21): 2654-2661.
- Kim, C. H., H. W. Lim, J. R. Kim, L. Rott, P. Hillsamer and E. C. Butcher (2004). "Unique gene expression program of human germinal center T helper cells." *Blood* **104**(7): 1952-1960.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Kim, D. I., S. C. Jensen, K. A. Noble, B. Kc, K. H. Roux, K. Motamedchaboki and K. J. Roux (2016). "An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling." *Mol Biol Cell* **27**(8): 1188-1196.
- Kim, S., H. Jin, H. R. Seo, H. J. Lee and Y. S. Lee (2019). "Regulating BRCA1 protein stability by cathepsin S-mediated ubiquitin degradation." *Cell Death Differ* **26**(5): 812-825.
- Kim, S. J., S. Schatzle, S. S. Ahmed, W. Haap, S. H. Jang, P. K. Gregersen, G. Georgiou and B. Diamond (2017). "Increased cathepsin S in Prdm1(-/-) dendritic cells alters the TFH cell repertoire and contributes to lupus." *Nat Immunol* **18**(9): 1016-1024.
- Kos, J., M. Krasovec, N. Cimerman, H. J. Nielsen, I. J. Christensen and N. Br nner (2000). "Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis." *Clin Cancer Res* **6**(2): 505-511.
- Koues, O. I., R. A. Kowalewski, L. W. Chang, S. C. Pyfrom, J. A. Schmidt, H. Luo, L. E. Sandoval, T. B. Hughes, J. J. Bednarski, A. F. Cashen, J. E. Payton and E. M. Oltz (2015). "Enhancer sequence variants and transcription-factor deregulation synergize to construct pathogenic regulatory circuits in B-cell lymphoma." *Immunity* **42**(1): 186-198.
- Kridel, R., L. H. Sehn and R. D. Gascoyne (2012). "Pathogenesis of follicular lymphoma." *J Clin Invest* **122**(10): 3424-3431.
- Kumar, E., L. Pickard and J. Okosun (2021). "Pathogenesis of follicular lymphoma: genetics to the microenvironment to clinical translation." *British Journal of Haematology* **194**(5): 810-821.
- Küppers, R., U. Klein, M. L. Hansmann and K. Rajewsky (1999). "Cellular origin of human B-cell lymphomas." *N Engl J Med* **341**(20): 1520-1529.
- Liu, M., J. L. Duke, D. J. Richter, C. G. Vinuesa, C. C. Goodnow, S. H. Kleinstein and D. G. Schatz (2008). "Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation." *Nature* **451**(7180): 841-845.
- Matsumoto, F., S. Saitoh, R. Fukui, T. Kobayashi, N. Tanimura, K. Konno, Y. Kusumoto, S. Akashi-Takamura and K. Miyake (2008). "Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses." *Biochem Biophys Res Commun* **367**(3): 693-699.
- Maubach, G., K. Schilling, W. Rommerskirch, I. Wenz, J. E. Schultz, E. Weber and B. Wiederanders (1997). "The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action." *Eur J Biochem* **250**(3): 745-750.
- McDonnell, T. J., N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn and S. J. Korsmeyer (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." *Cell* **57**(1): 79-88.
- Mediavilla-Varela, M., F. J. Pacheco, F. Almaguel, J. Perez, E. Sahakian, T. R. Daniels, L. S. Leoh, A. Padilla, N. R. Wall, M. B. Lilly, M. De Leon and C. A. Casiano (2009). "Docetaxel-induced prostate cancer cell death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by LEDGF/p75." *Mol Cancer* **8**: 68.
- Mellacheruvu, D., Z. Wright, A. L. Couzens, J. P. Lambert, N. A. St-Denis, T. Li, Y. V. Miteva, S. Hauri, M. E. Sardi, T. Y. Low, V. A. Halim, R. D. Bagshaw, N. C. Hubner, A. Al-Hakim, A. Bouchard, D. Faubert, D. Fermin, W. H. Dunham, M. Goudreault, Z. Y. Lin, B. G. Badillo, T. Pawson, D. Durocher, B. Coulombe, R. Aebersold, G. Superti-Furga, J. Colinge, A. J. Heck, H. Choi, M. Gstaiger, S. Mohammed, I. M. Cristea, K. L. Bennett, M. P. Washburn, B. Raught, R. M. Ewing, A. C. Gingras and A. I. Nesvizhskii (2013). "The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data." *Nat Methods* **10**(8): 730-736.
- Mlynarczyk, C., L. Fontán and A. Melnick (2019). "Germinal center-derived lymphomas: The darkest side of humoral immunity." *Immunological Reviews* **288**(1): 214-239.
- Mohamed, M. M. and B. F. Sloane (2006). "multifunctional enzymes in cancer." *Nature Reviews Cancer* **6**(10): 764-775.
- Mondello, P., A. Fama, M. C. Larson, A. L. Feldman, J. C. Villasboas, Z. Z. Yang, I. Galkin, V. Svelolkin, E. Postovalova, A. Bagaev, P. Ovcharov, A. Varlamova, S. Huet, B. Tesson, K. R. McGrath, S. Slager, B. K. Link, S. Syrbu, A. J. Novak, T. M. Habermann, T. E. Witzig, G. S.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Nowakowski, G. Salles, J. R. Cerhan and S. M. Ansell (2021). "Lack of intrafollicular memory CD4 + T cells is predictive of early clinical failure in newly diagnosed follicular lymphoma." Blood Cancer J **11**(7): 130.
- Mondello, P., S. Tadros, M. Teater, L. Fontan, A. Y. Chang, N. Jain, H. Yang, S. Singh, H. Y. Ying, C. S. Chu, M. C. J. Ma, E. Toska, S. Alig, M. Durant, E. de Stanchina, S. Ghosh, A. Mottok, L. Nastoupil, S. S. Neelapu, O. Weigert, G. Inghirami, J. Baselga, A. Younes, C. Yee, A. Dogan, D. A. Scheinberg, R. G. Roeder, A. M. Melnick and M. R. Green (2020). "Selective Inhibition of HDAC3 Targets Synthetic Vulnerabilities and Activates Immune Surveillance in Lymphoma." Cancer Discov **10**(3): 440-459.
- MORT, J. S., M.-C. MAGNY and E. R. LEE (1998). "Cathepsin B: an alternative protease for the generation of an aggrecan 'metalloproteinase' cleavage neopeptide." Biochemical Journal **335**(3): 491-494.
- Morton, P. A., M. L. Zacheis, K. S. Giacometto, J. A. Manning and B. D. Schwartz (1995). "Delivery of nascent MHC class II-invariant chain complexes to lysosomal compartments and proteolysis of invariant chain by cysteine proteases precedes peptide binding in B-lymphoblastoid cells." J Immunol **154**(1): 137-150.
- Mulaomerović, A., A. Halilbasić, E. Cickusić, T. Zavasnik-Bergant, L. Begić and J. Kos (2007). "Cystatin C as a potential marker for relapse in patients with non-Hodgkin B-cell lymphoma." Cancer Lett **248**(2): 192-197.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai and T. Honjo (2000). "Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme." Cell **102**(5): 553-563.
- Nakagawa, T. Y., W. H. Brissette, P. D. Lira, R. J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J. D. McNeish, S. E. Eastman, E. D. Howard, S. R. Clarke, E. F. Rosloniec, E. A. Elliott and A. Y. Rudensky (1999). "Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice." Immunity **10**(2): 207-217.
- O'Shea, D., C. O'Riain, C. Taylor, R. Waters, E. Carlotti, F. Macdougall, J. Gribben, A. Rosenwald, G. Ott, L. M. Rimsza, E. B. Smeland, N. Johnson, E. Campo, T. C. Greiner, W. C. Chan, R. D. Gascoyne, G. Wright, L. M. Staudt, T. A. Lister and J. Fitzgibbon (2008). "The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival." Blood **112**(8): 3126-3129.
- Ochieng, J. and G. Chaudhuri (2010). "Cystatin superfamily." J Health Care Poor Underserved **21**(1 Suppl): 51-70.
- Ogilvy, S., D. Metcalf, C. G. Print, M. L. Bath, A. W. Harris and J. M. Adams (1999). "Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(26): 14943-14948.
- Okosun, J., C. Bodor, J. Wang, S. Araf, C. Y. Yang, C. Pan, S. Boller, D. Cittaro, M. Bozek, S. Iqbal, J. Matthews, D. Wrench, J. Marzec, K. Tawana, N. Popov, C. O'Riain, D. O'Shea, E. Carlotti, A. Davies, C. H. Lawrie, A. Matolcsy, M. Calaminici, A. Norton, R. J. Byers, C. Mein, E. Stupka, T. A. Lister, G. Lenz, S. Montoto, J. G. Gribben, Y. Fan, R. Grosschedl, C. Chelala and J. Fitzgibbon (2014). "Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma." Nat Genet **46**(2): 176-181.
- Olson, O. C. and J. A. Joyce (2015). "Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response." Nat Rev Cancer **15**(12): 712-729.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-13771.
- Park, B., M. M. Brinkmann, E. Spooner, C. C. Lee, Y. M. Kim and H. L. Ploegh (2008). "Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9." Nat Immunol **9**(12): 1407-1414.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Pasqualucci, L., M. Compagno, J. Houldsworth, S. Monti, A. Grunn, S. V. Nandula, J. C. Aster, V. V. Murty, M. A. Shipp and R. Dalla-Favera (2006). "Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma." *J Exp Med* **203**(2): 311-317.
- Pastore, A., 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. Neuberger, P. Moller, 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 (2015). "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 Oncol* **16**(9): 1111-1122.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." *J Comput Chem* **25**(13): 1605-1612.
- Phelan, J. D., R. M. Young, D. E. Webster, S. Roulland, G. W. Wright, M. Kasbekar, A. L. Shaffer, 3rd, 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 (2018). "A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma." *Nature* **560**(7718): 387-391.
- Polajnar, M., T. Zavašnik-Bergant, N. Kopitar-Jerala, M. Tušek-Žnidarič and E. Žerovnik (2014). "Gain in toxic function of stefin B EPM1 mutants aggregates: Correlation between cell death, aggregate number/size and oxidative stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**(9): 2089-2099.
- Poltorak, A., I. Smirnova, X. He, M. Y. Liu, C. Van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E. K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S. N. Vogel and B. Beutler (1998). "Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region." *Blood Cells Mol Dis* **24**(3): 340-355.
- Qu, X., H. Li, R. M. Braziel, V. Passerini, L. M. Rimsza, E. D. Hsi, J. P. Leonard, S. M. Smith, R. Kridel, O. Press, O. Weigert, M. LeBlanc, J. W. Friedberg and M. Fang (2019). "Genomic alterations important for the prognosis in patients with follicular lymphoma treated in SWOG study S0016." *Blood* **133**(1): 81-93.
- Quraishi, O. and A. C. Storer (2001). "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." *J Biol Chem* **276**(11): 8118-8124.
- Rabkin, C. S., C. Hirt, S. Janz and G. Dolken (2008). "t(14;18) Translocations and risk of follicular lymphoma." *J Natl Cancer Inst Monogr*(39): 48-51.
- Rasheed, A. U., H. P. Rahn, F. Sallusto, M. Lipp and G. Müller (2006). "Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression." *Eur J Immunol* **36**(7): 1892-1903.
- Reimann, K. A., M. Chernoff, C. L. Wilkening, C. E. Nickerson and A. L. Landay (2000). "Preservation of lymphocyte immunophenotype and proliferative responses in cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus type 1-infected donors: implications for multicenter clinical trials. The ACTG Immunology Advanced Technology Laboratories." *Clin Diagn Lab Immunol* **7**(3): 352-359.
- Repnik, U., M. H. Cesen and B. Turk (2016). "Measuring Cysteine Cathepsin Activity to Detect Lysosomal Membrane Permeabilization." *Cold Spring Harb Protoc* **2016**(5).
- Rickert, R. C., J. Roes and K. Rajewsky (1997). "B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice." *Nucleic Acids Res* **25**(6): 1317-1318.

Riese, R. J., R. N. Mitchell, J. A. Villadangos, G. P. Shi, J. T. Palmer, E. R. Karp, G. T. De Sanctis, H. L. Ploegh and H. A. Chapman (1998). "Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity." *J Clin Invest* **101**(11): 2351-2363.

Rinne, R., P. Saukko, M. Järvinen and A. E. Lehesjoki (2002). "Reduced cystatin B activity correlates with enhanced cathepsin activity in progressive myoclonus epilepsy." *Ann Med* **34**(5): 380-385.

Roider, T., M. A. Baertsch, D. Fitzgerald, H. Voehringer, B. J. Brinkmann, F. Czernilofsky, M. Knoll, L. Llaó-Cid, P.-M. Bruch, N. Liebers, C. M. Schürch, V. Passerini, A. Brobeil, G. Mechttersheimer, C. Müller-Tidow, O. Weigert, M. Seiffert, G. P. Nolan, W. Huber and S. Dietrich (2022). "Multimodal and spatially resolved profiling identifies distinct patterns of T-cell infiltration in nodal B-cell lymphoma entities." *bioRxiv*: 2022.2011.2004.514366.

Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." *J Mol Biol* **234**(3): 779-815.

Salomon-Ferrer, R., A. W. Gotz, D. Poole, S. Le Grand and R. C. Walker (2013). "Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald." *J Chem Theory Comput* **9**(9): 3878-3888.

Santos-Rosa, H., A. Kirmizis, C. Nelson, T. Bartke, N. Saksouk, J. Cote and T. Kouzarides (2009). "Histone H3 tail clipping regulates gene expression." *Nat Struct Mol Biol* **16**(1): 17-22.

Schlabrakowski Dr. med., A. (2003). Spezifität der Inhibition von Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen durch ihre Propeptide.

Schmitz, R., G. W. Wright, D. W. Huang, C. A. Johnson, J. D. Phelan, J. Q. Wang, S. Roulland, M. Kasbekar, R. M. Young, A. L. Shaffer, D. J. Hodson, W. Xiao, X. Yu, Y. Yang, H. Zhao, W. Xu, X. Liu, B. Zhou, W. Du, W. C. Chan, E. S. Jaffe, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, E. Campo, A. Lopez-Guillermo, A. Rosenwald, G. Ott, J. Delabie, L. M. Rimsza, K. Tay Kuang Wei, A. D. Zelenetz, J. P. Leonard, N. L. Bartlett, B. Tran, J. Shetty, Y. Zhao, D. R. Soppet, S. Pittaluga, W. H. Wilson and L. M. Staudt (2018). "Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *N Engl J Med* **378**(15): 1396-1407.

Scott, D. W. and R. D. Gascoyne (2014). "The tumour microenvironment in B cell lymphomas." *Nat Rev Cancer* **14**(8): 517-534.

Serrano-Puebla, A. and P. Boya (2018). "Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells." *Biochem Soc Trans* **46**(2): 207-215.

Shah, A. and B. Bano (2009). "Cystatins in Health and Diseases." *Int J Pept Res Ther* **15**(1): 43.

Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen and M. Mann (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." *Nat Protoc* **1**(6): 2856-2860.

Shi, G. P., J. A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K. J. Haley, R. Riese, H. L. Ploegh and H. A. Chapman (1999). "Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development." *Immunity* **10**(2): 197-206.

Sobotič, B., M. Vizovišek, R. Vidmar, P. Van Damme, V. Gocheva, J. A. Joyce, K. Gevaert, V. Turk, B. Turk and M. Fonović (2015). "Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells." *Mol Cell Proteomics* **14**(8): 2213-2228.

Son, E. D., H. Kim, H. Choi, S. H. Lee, J. Y. Lee, S. Kim, B. Closs, S. Lee, J. H. Chung and J. S. Hwang (2009). "Cathepsin G increases MMP expression in normal human fibroblasts through fibronectin fragmentation, and induces the conversion of proMMP-1 to active MMP-1." *J Dermatol Sci* **53**(2): 150-152.

Song, M. K., B. B. Park and J. Uhm (2019). "Understanding Immune Evasion and Therapeutic Targeting Associated with PD-1/PD-L1 Pathway in Diffuse Large B-cell Lymphoma." *Int J Mol Sci* **20**(6).

Stoka, V., B. Turk and V. Turk (2005). "Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis." *IUBMB Life* **57**(4-5): 347-353.

Stolz, S. (2021). Validierung und funktionelle Charakterisierung einer Cathepsin S - Gain-of-Function Mutation im Follikulären Lymphom Dissertation, LMU München.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Storm van's Gravesande, K., M. D. Layne, Q. Ye, L. Le, R. M. Baron, M. A. Perrella, L. Santambrogio, E. S. Silverman and R. J. Riese (2002). "IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression." *J Immunol* **168**(9): 4488-4494.
- Strasser, A., A. G. Elefanty, A. W. Harris and S. Cory (1996). "Progenitor tumours from Emu-bcl-2-myc transgenic mice have lymphomyeloid differentiation potential and reveal developmental differences in cell survival." *Embo j* **15**(15): 3823-3834.
- Stubbs, M. T., B. Laber, W. Bode, R. Huber, R. Jerala, B. Lenarcic and V. Turk (1990). "The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction." *EMBO J* **9**(6): 1939-1947.
- Swerdlow, S. H., 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 (2016). "The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms." *Blood* **127**(20): 2375-2390.
- Takeuchi, O., T. Kawai, H. Sanjo, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. Takeda and S. Akira (1999). "TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family." *Gene* **231**(1-2): 59-65.
- Tamhane, T., R. Llukumbura, S. Lu, G. M. Maelandsmo, M. H. Haugen and K. Brix (2016). "Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells." *Biochimie* **122**: 208-218.
- Tao, K., N. A. Stearns, J. Dong, Q. L. Wu and G. G. Sahagian (1994). "The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit." *Arch Biochem Biophys* **311**(1): 19-27.
- Tedelind, S., K. Poliakova, A. Valeta, R. Hunegnaw, E. L. Yemanaberhan, N. E. Heldin, J. Kurebayashi, E. Weber, N. Kopitar-Jerala, B. Turk, M. Bogoy and K. Brix (2010). "Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells." *Biol Chem* **391**(8): 923-935.
- Tobin, J. W. D., C. Keane, J. Gunawardana, P. Mollee, S. Birch, T. Hoang, J. Lee, L. Li, L. Huang, V. Murigneux, J. L. Fink, N. Matigian, F. Vari, S. Francis, R. Kridel, O. Weigert, S. Haebe, V. Jurinovic, W. Klapper, C. Steidl, L. H. Sehn, S. C. Law, M. N. Wykes and M. K. Gandhi (2019). "Progression of Disease Within 24 Months in Follicular Lymphoma Is Associated With Reduced Intratumoral Immune Infiltration." *J Clin Oncol* **37**(34): 3300-3309.
- Trstenjak Prebanda, M., P. Matjan-Stefin, B. Turk and N. Kopitar-Jerala (2021). "Altered Expression of Peroxiredoxins in Mouse Model of Progressive Myoclonus Epilepsy upon LPS-Induced Neuroinflammation." *Antioxidants (Basel)* **10**(3).
- Tsiagbe, V. K., J. Asakawa, A. Miranda, R. M. Sutherland, Y. Paterson and G. J. Thorbecke (1993). "Syngeneic response to SJL follicular center B cell lymphoma (reticular cell sarcoma) cells is primarily in V beta 16+ CD4+ T cells." *J Immunol* **150**(12): 5519-5528.
- Turk, B., J. G. Bieth, I. Bjork, I. Dolenc, D. Turk, N. Cimerman, J. Kos, A. Colic, V. Stoka and V. Turk (1995). "Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(4): 225-230.
- Turk, B., V. Stoka, I. Björk, C. Boudier, G. Johansson, I. Dolenc, A. Colic, J. G. Bieth and V. Turk (1995). "High-affinity binding of two molecules of cysteine proteinases to low-molecular-weight kininogen." *Protein Sci* **4**(9): 1874-1880.
- Turk, B., V. Stoka, J. Rozman-Pungercar, T. Cirman, G. Droga-Mazovec, K. Oresic and V. Turk (2002). "Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases." *Biol Chem* **383**(7-8): 1035-1044.
- Turk, B., V. Stoka, V. Turk, G. Johansson, J. J. Cazzulo and I. Björk (1996). "High-molecular-weight kininogen binds two molecules of cysteine proteinases with different rate constants." *FEBS Lett* **391**(1-2): 109-112.
- Turk, B., D. Turk and G. S. Salvesen (2002). "Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators." *Curr Pharm Des* **8**(18): 1623-1637.
- Turk, B., D. Turk and V. Turk (2000). "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 98-111.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

- Turk, V. and W. Bode (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases." FEBS Lett **285**(2): 213-219.
- Turk, V., V. Stoka and D. Turk (2008). "Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance." Front Biosci **13**: 5406-5420.
- Turk, V., V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk and D. Turk (2012). "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers." Biochim Biophys Acta **1824**(1): 68-88.
- Turner, V. M., S. Gardam and R. Brink (2010). "Lineage-specific transgene expression in hematopoietic cells using a Cre-regulated retroviral vector." J Immunol Methods **360**(1-2): 162-166.
- Tusar, L., A. Usenik, B. Turk and D. Turk (2021). "Mechanisms Applied by Protein Inhibitors to Inhibit Cysteine Proteases." Int J Mol Sci **22**(3).
- Uhlén, M., L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Pontén (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." Science **347**(6220): 1260419.
- Umetsu, D. T., L. Esserman, T. A. Donlon, R. H. DeKruyff and R. Levy (1990). "Induction of proliferation of human follicular (B type) lymphoma cells by cognate interaction with CD4+ T cell clones." J Immunol **144**(7): 2550-2557.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J. A. Leunissen (2007). "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W71-74.
- Vasiljeva, O., M. Dolinar, J. R. Pungercar, V. Turk and B. Turk (2005). "Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans." FEBS Lett **579**(5): 1285-1290.
- Vidak, E., U. Javorsek, M. Vizovisek and B. Turk (2019). "Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment." Cells **8**(3).
- Wallin, H., M. Bjarnadottir, L. K. Vogel, J. Wassélius, U. Ekström and M. Abrahamson (2010). "Cystatins--Extra- and intracellular cysteine protease inhibitors: High-level secretion and uptake of cystatin C in human neuroblastoma cells." Biochimie **92**(11): 1625-1634.
- Wang, B., J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H. A. Chapman, R. Kalluri and G. P. Shi (2006). "Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors." J Biol Chem **281**(9): 6020-6029.
- Weigert, O., 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 (2012). "Molecular ontogeny of donor-derived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation." Cancer Discov **2**(1): 47-55.
- Weigert, O. and D. M. Weinstock (2017). "The promises and challenges of using gene mutations for patient stratification in follicular lymphoma." Blood **130**(13): 1491-1498.
- Weinstein, J. N., E. A. Collisson, G. B. Mills, K. R. Shaw, B. A. Ozenberger, K. Ellrott, I. Shmulevich, C. Sander and J. M. Stuart (2013). "The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project." Nat Genet **45**(10): 1113-1120.
- Werle, B., U. Schanzenbächer, T. T. Lah, E. Ebert, B. Jülke, W. Ebert, W. Fiehn, K. Kayser, E. Spiess, M. Abrahamson and J. Kos (2006). "Cystatins in non-small cell lung cancer: tissue levels, localization and relation to prognosis." Oncol Rep **16**(4): 647-655.
- Wiener, J. J., S. Sun and R. L. Thurmond (2010). "Recent advances in the design of cathepsin S inhibitors." Curr Top Med Chem **10**(7): 717-732.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

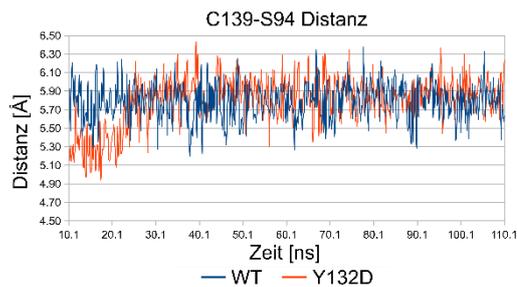
Wilkinson, R. D., R. Williams, C. J. Scott and R. E. Burden (2015). "Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential." *Biol Chem* **396**(8): 867-882.

Yam, C. S. a. H., A. M (2013). "Whole Spleen Flow Cytometry Assay." *Bio-protocol* **3**(15).

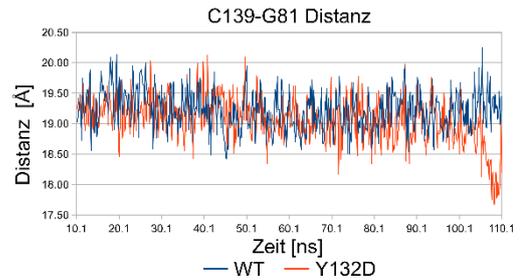
Zhang, C., Z. Zeng, D. Cui, S. He, Y. Jiang, J. Li, J. Huang and K. Pu (2021). "Semiconducting polymer nano-PROTACs for activatable photo-immunometabolic cancer therapy." *Nature Communications* **12**(1): 2934.

Anhang

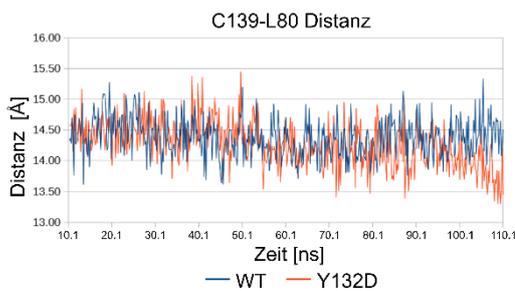
A



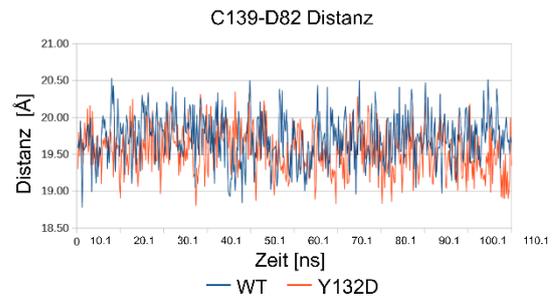
B



C

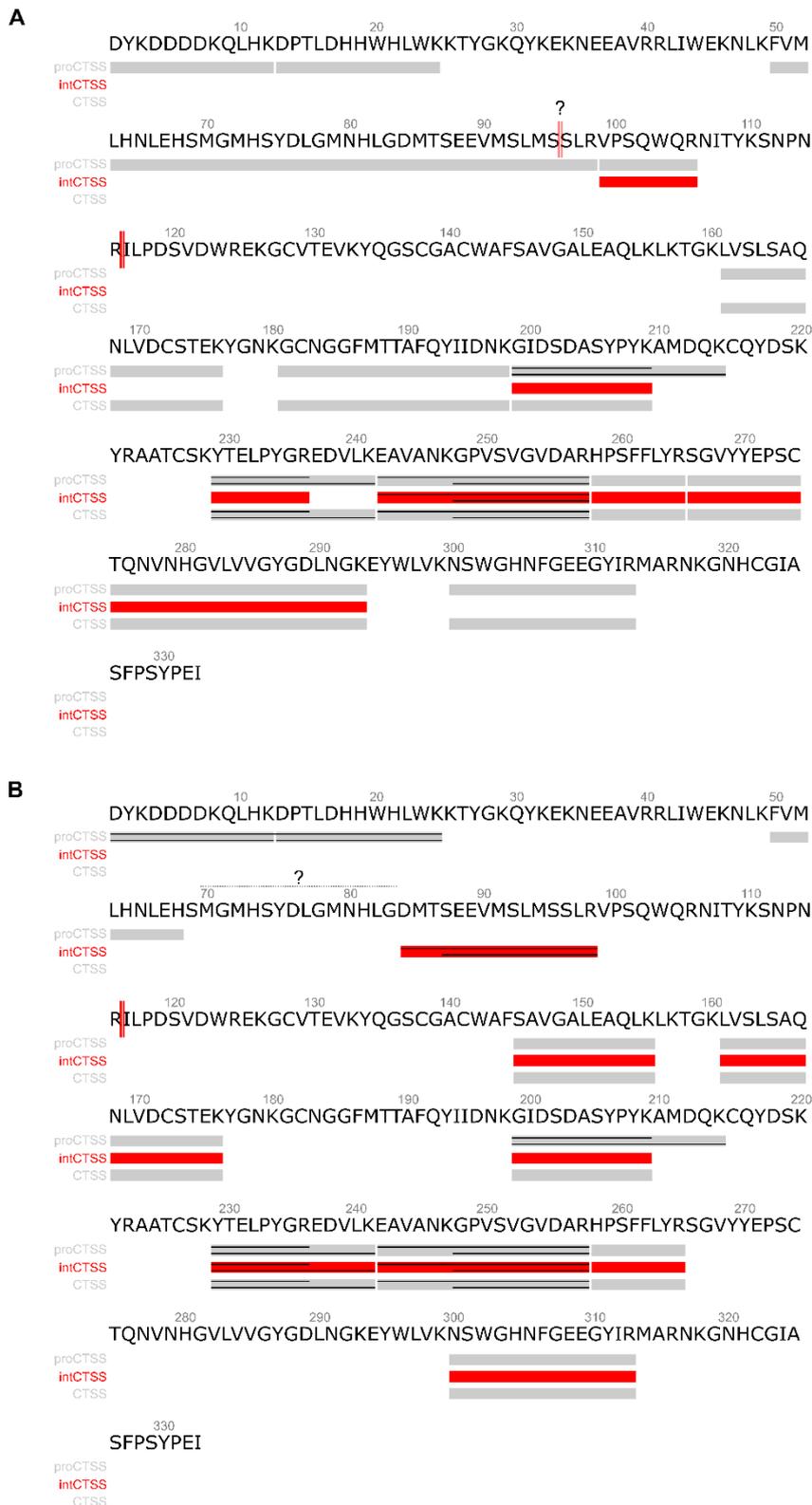


D



Anhang 1 CTSS-Strukturmodellierung von CTSS^{WT} gegenüber CTSS^{Y132D}.

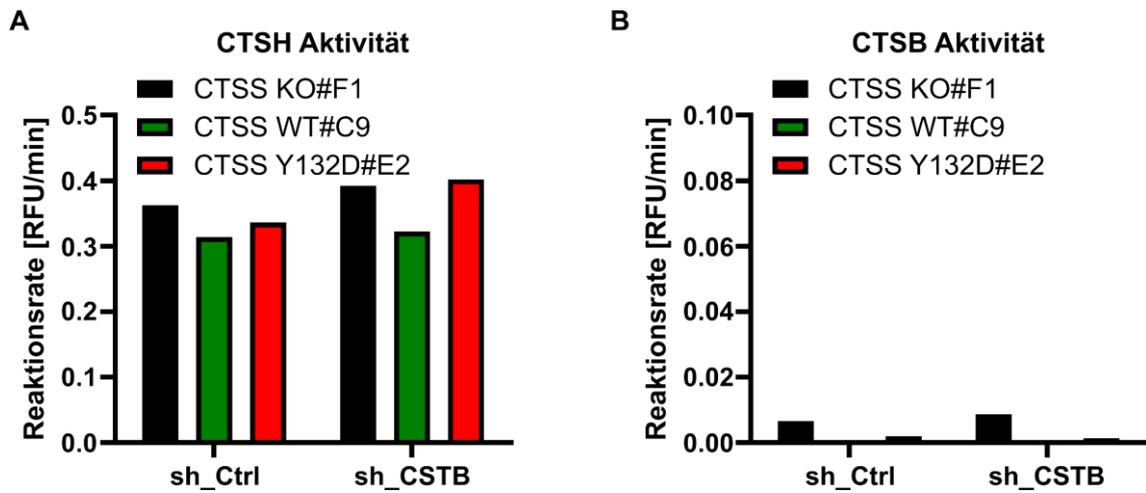
A-D) MD-Simulationen der molekularen Abstände zwischen den Massenzentren der Atome: C139 und S94 (A), C139 und G81 (B), C139 und L80 (C), und C139 und D82 (D) (Y132D vs. WT); Å = Ångström, ns = Nanosekunden.



Anhang 2 Durch Massenspektroskopie identifizierte Peptidfragmente nach A) tryptischem und B) semi-tryptischen Verdau von aufgereinigtem FLAG-markiertem pro-, int- (rot) und aktivem CTSS.

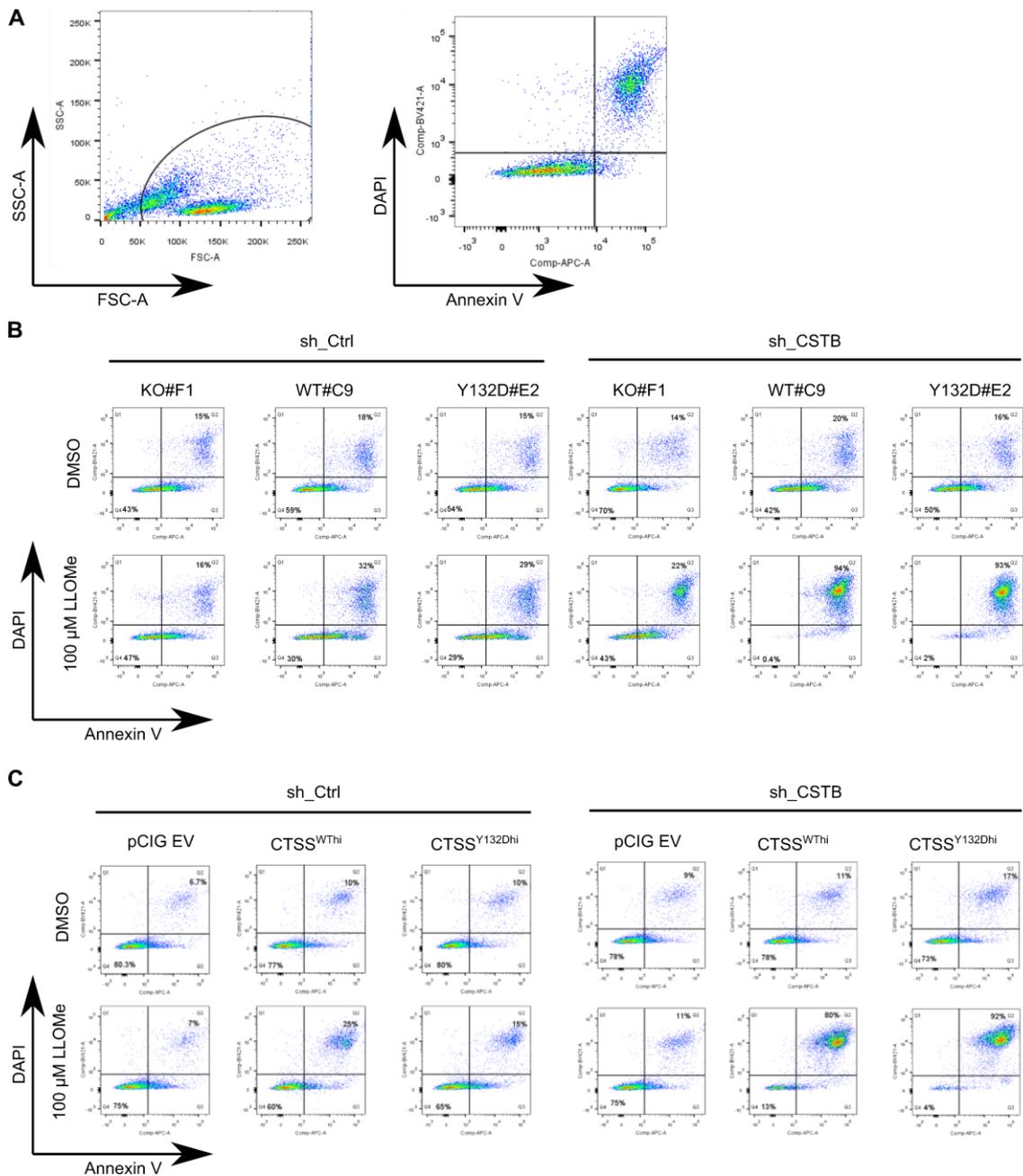
Die dicken Balken spiegeln die identifizierten Peptide wider, schwarze Linien zeigen überlappende Sequenzen an. Rote vertikale Doppelbalken zeigen die bekannten und vorgeschlagenen Spaltstellen nach CTSS^{R113} (hier: CTSS^{R115}) bzw. nach CTSS^{S94} (hier: CTSS^{S96}, hellrot). Das Fragezeichen über der gestrichelten Linie zeigt eine mögliche Region der autokatalytischen Spaltung an, die zu intCTSS führt.

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom



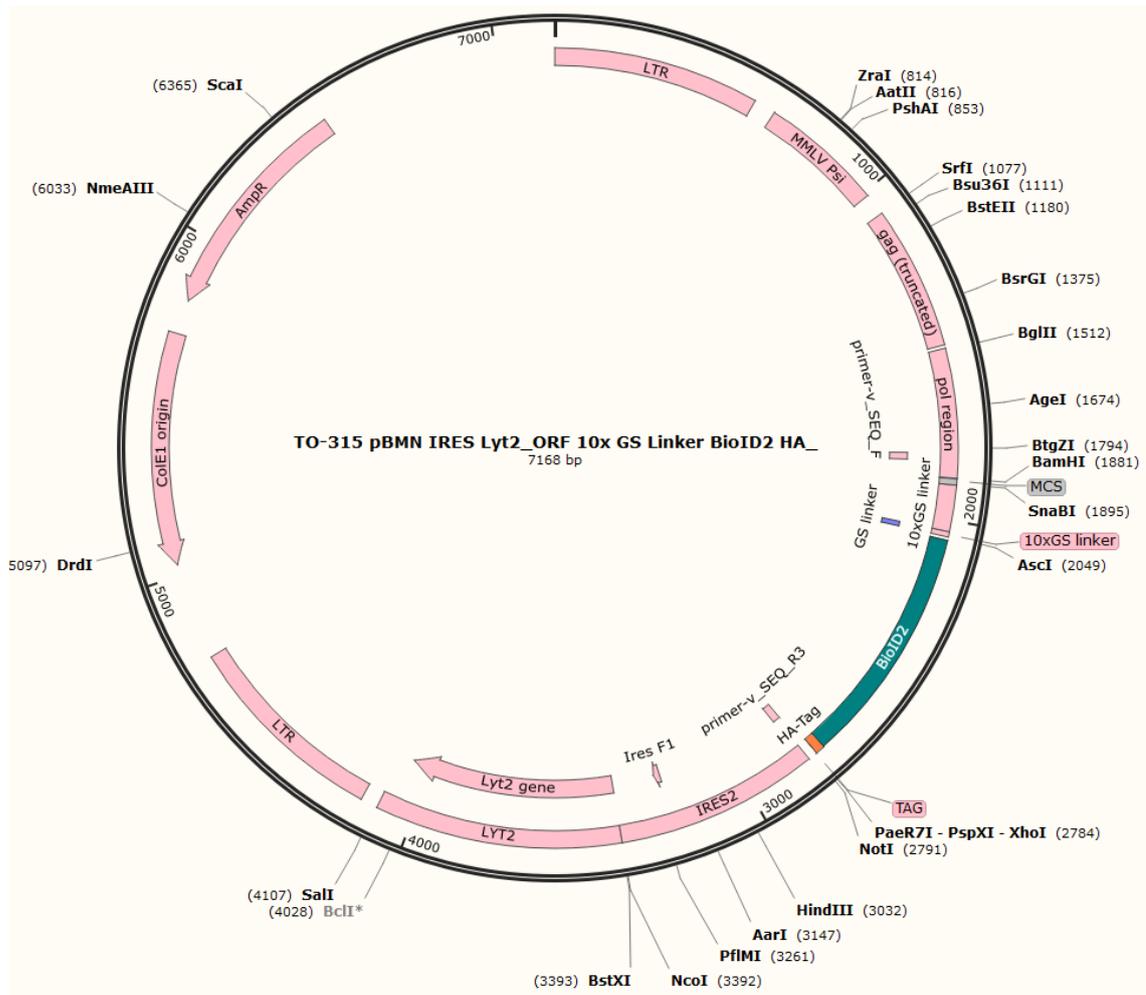
Anhang 3 Untersuchung der Substratschneideaktivität verschiedener Cathepsin-Substrate in Karpas422 Zellen.

A) Die Reaktionsrate von CTSH und B) die Reaktionsrate von CTSB. RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten.



Anhang 4. Annexin V Assay nach 2-stündiger LLOMe Behandlung.

A) Gating Strategie. FSC-A = Forward-Scatter, SSC-A = Sideward-Scatter. B) Beispieldaten mit Karpas422 Zellen mit und ohne CSTB k/d mit LLOMe behandelt. DMSO als Kontrolle. C) Wie B) mit DG75 Zellen.



Anhang 5 Plasmid Karte des C-terminalen BioID2 Expressionsvektors.

Tabelle 3 Auflistung der identifizierten Proteine mittels BioID2 unter Verwendung der angegebenen Filter.

CRAPome gefiltert		GO gefiltert		UNIPROT gefiltert	
Karpas422	DG75	Karpas422	DG75	Karpas422	DG75
ADPRHL1	AAR2	ANKRD44	ACAP1	CAMK2D	ANAPC7
AGO3	AARSD1	ASF1A	AIM1	CARD11	ARHGEF6
AGPAT5	ACAD8	CCP110	AK4	PARP9	CAMK2D
AIP	ACAP1	CNPY4	BACH1	PFND5	CBFB
AKR7L	ACSL3	EBF1	BCCIP	RASAL3	CD74
ANKRD44	AGPS	ERAP2	BRI3BP	AIP	CHID1
APRT	AIM1	FCRLA	CALR	ATM	CNPY3
ARPC4	AK4	GNB1	CD22	BCL6	COPS2
ASF1A	ANAPC7	LARP4B	CDC37	CBR4	COPS4
ASPH	ANXA2	PIK3AP1	CEP192	CNPY3	CORO1A
ATM	ANXA2P2	PPP6R1	CEP85	CTSC	DVL1
ATP2A3	APMAP	PSME1	CHCHD3	HLA-DQB1	ERCC2
ATXN3	ARFGEF1	PTPN2	CHCHD6	HLA-DRB1	ERCC4
BCKDHA	ARFGEF2	PTPN6	CNOT10	IRF8	EXOSC3
BCKDHB	ARHGEF6	TAF6	CNOT11	PSMD14	EXOSC4
BCL6	ARPC4	TBC1D5	CNOT2	PSMD6	EXOSC5
BIRC6	ASNS	TRABD	CNOT7	PSMD7	EXOSC7
BTF3L4	ASPH	TTC37	CNPY4		GUF1
CALR	ATXN2	TTF2	CSNK2A1		HLA-DQB1
CALU	ATXN3	UPRT	CSNK2A3		HLA-DRB1
CAMK2D	BACH1	WDFY4	DEPTOR		HLA-DRB1
CARD11	BCCIP	WDR92	DERL1		HSPA1A
CBR4	BICD2	ABHD14B	DIS3L		HSPA1B
CBWD1	BIRC6	AGO3	DVL1P1		IGHM
CCP110	BRI3BP	ATXN3	EHD1		IGKC
CEP131	C15orf52	CALR	EIF2S3		IKZF1
CEP97	C2orf44	CHCHD3	EIF2S3L		JAK1
CHCHD3	CALR	CNOT10	EIF3C		MAP4K2
CHCHD6	CALU	CNOT11	EIF3CL		MEF2B
CLN6	CAMK2D	CNOT3	EIF3H		NFATC1
CNOT10	CARS	CSK	EIF3L		NUP62
CNOT11	CBFB	DOCK2	ERAP1		OTULIN
CNOT3	CCDC132	DTX3L	ERAP2		PABPC1
CNPY3	CD22	EIF2B3	FASTKD5		PFND5
CNPY4	CD74	HAUS1	FCRLA		POLR2B
COPB2	CDC37	HAUS4	FERMT3		PSMA1
CSK	CDIPT	MIOS	FHL3		PSMB3
CSTB	CEP192	MRPL12	GNAS		PSMB5
CTSC	CEP85	MS4A1	GNB1		PSMB6
CTSS	CHCHD3	MX1	GNB2		PSMC1
CUL5	CHCHD6	NLRP2	GNB4		PSMD13
DBT	CHID1	NME4	HAUS1		PSMD14
DDHD1	CNOT10	NSFL1C	HAUS4		PSMD2
DDX20	CNOT11	NUP210	HCLS1		PSMD6
DECR1	CNOT2	PAN3	HIP1R		PSMD7
DHRS4	CNOT7	PANK4	IGJ		RASAL3
DHRS7	CNPY3	RAB33A	IGKV3D-20		RFTN1
DOCK2	CNPY4	RAB3GAP1	IKBIP		RPA2
DTX3L	COA7	RAD50	IL4I1		RPL22L1
EBF1	COPS2	SCYL1	IPO8		RPS27A
EIF2B3	COPS4	SEC13	ITGB2		RPS6KA5
ERAP2	CORO1A	SMPD4	LCP1		SARS
ERGIC3	CORO7	TAF10	LRMP		SET
ESYT2	CSNK2A1	TAF4	MAGEA9		TCEA1
FAR1	CSNK2A3	TAF8	MED20		TGFB1
FCRLA	CTSS	TANK	MED4		TRADD
FDFT1	DECR1	TAP2	MESDC2		TYK2
FKBP15	DECR2	TBC1D4	MYL12A		UBA52
FLOT2	DEPTOR	WDR61	MYL12B		UBB
GCH1	DERL1	CHCHD6	NUCB1		UBC
GEMIN6	DHCR7	IKBIP	NUCB2		
GK3P	DHRS7B	SAMM50	NUP205		
GNB1	DIS3L	TMED9	NUP210		
GPX7	DLAT	TRRAP	PGAM5		
GTPBP3	DNAJB6		POLR1C		
HAUS1	DPCD		PTPN7		
HAUS4	DTYMK		PURA		
HERC1	DVL1		RAB27A		
HLA-DQB1	DVL1P1		RAB3GAP1		
HLA-DRB1	ECHDC1		RAD51		
HSD17B8	EHD1		RIC8A		
HSDL1	EIF2S3		RLTPR		
HSPBP1	EIF2S3L		RQCD1		
HSPE1	EIF3C		RRAS2		
IGHG1	EIF3CL		SAMHD1		
IKBIP	EIF3H		SAMM50		
IMMP2L	EIF3L		SERPINB1		
IMMT	ERAP1		SORL1		
IRF8	ERAP2		TADA1		
IVD	ERCC2		TAF10		
LARP4B	ERCC4		TAF4		
LMAN1	ERGIC3		TAF6		
LNPEP	ERP29		TAF6L		
MDH2	EXOSC3		TMED10		
METTL17	EXOSC4		TMED9		
METTL7A	EXOSC5		TRRAP		
MFN1	EXOSC7		YEATS4		
MIA2	FAM21A		ATXN3		
MIA3	FAM21C		MRPL12		
MIOS	FAM98B		NSFL1C		

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

MLYCD	FASTKD5
MMAA	FCRLA
MOGS	FERMT3
MPV17	FHL3
MRPL12	FKBP15
MRPS10	GARS
MRPS11	GBAS
MRPS16	GEMIN4
MRPS17	GFPT1
MRPS2	GGH
MRPS22	GLUD1
MRPS24	GLUD2
MRPS25	GNAS
MRPS26	GNB1
MRPS28	GNB2
MRPS31	GNB4
MRPS34	GNPTAB
MRPS35	GNPTG
MRPS5	GOLIM4
MRPS7	GTPBP3
MS4A1	GUF1
MTHFD2	GUSB
MTX2	HAUS1
MX1	HAUS4
NCF1B	HCLS1
NCKAP5L	HERC1
NDUFA5	HIP1R
NDUFAF5	HLA-DQB1
NDUFS8	HLA-DRA
NLRP2	HLA-DRB1
NME4	HSPA1A
NOMO1	HSPA1B
NSFL1C	HSPE1
NUP210	HYOU1
ORMDL3	IGHM
OS9	IGJ
OSBPL8	IGKC
P4HA1	IGKV3D-20
PAN3	IKBIP
PANK4	IKZF1
PARP9	IL4I1
PBDC1	IMMT
PEX6	IPO8
PFDN2	ITGB2
PFDN4	JAK1
PFDN5	KIAA1033
PHKA1	LCP1
PIK3AP1	LEPRE1
PLCG2	LMAN1
PPM1K	LNPEP
PPP6R1	LPCAT1
PSMA3	LRMP
PSMB8	LRRC47
PSMD14	MAGEA9
PSMD6	MAP4K2
PSMD7	MED20
PSME1	MED4
PTCD3	MEF2B
PTPN2	MESDC2
PTPN6	MGMT
PTPRE	MGST1
PYGB	MIA2
RAB30	MIA3
RAB33A	MID1IP1
RAB33B	MMAB
RAB39A	MRPL12
RAB3GAP1	MRPL15
RAB9A	MRPL22
RABL2B	MRPL23
RAD50	MRPL43
RASAL3	MRPL47
RCN2	MRPL49
RNMT	MRPS10
RPE	MRPS11
SAMM50	MRPS15
SCYL1	MRPS17
SDHB	MRPS2
SEC13	MRPS22
SEC63	MRPS25
SEL1L	MRPS26
SFXN2	MRPS28
SLC25A15	MRPS31
SLC25A20	MRPS34
SLC25A22	MRPS35
SLC25A24	MRPS5
SLC35E1	MRPS7
SMPD4	MSTO1
SNAP23	MTX2
STT3B	MTX3
STX17	MYL12A
SUMF2	MYL12B
TAF10	NAPSA
TAF4	NCLN
TAF6	NDUFAF5
TAF8	NEU1
TANK	NFATC1
TAP2	NOMO1
TARS2	NOMO2
TBC1D4	NOMO3
TBC1D5	NPM3

Aberrante Cathepsin S Aktivität im Follikulären Lymphom

TIMMDC1	NSFL1C
TMED9	NUCB1
TMEM126A	NUCB2
TMEM38B	NUP205
TMEM97	NUP210
TMX1	NUP62
TRABD	OS9
TRAK1	OTULIN
TRRAP	OXSRI
TTC37	P4HA1
TTF2	PABPC1
UBE2G2	PABPC3
UGGT1	PDK3
UPRT	PFDN2
VPS13C	PFDN5
VPS45	PGAM1
WDFY4	PGAM2
WDR45	PGAM5
WDR61	PGM3
WDR92	PIGK
ZNHIT6	PLOD1
	PLOD3
	POGLUT1
	POLR1C
	POLR2B
	POTEF
	POTEJ
	PRKAG1
	PRKAR2A
	PRKAR2B
	PRKCSH
	PSAP
	PSAT1
	PSMA1
	PSMB3
	PSMB5
	PSMB6
	PSMC1
	PSMD13
	PSMD14
	PSMD2
	PSMD6
	PSMD7
	PTCD3
	PTPN7
	PURA
	PYCR1
	PYCR2
	QPRT
	RAB27A
	RAB3GAP1
	RAD51
	RASAL3
	RBFOX1
	RBFOX2
	RBFOX3
	RCN2
	RFTN1
	RIC8A
	RLTPR
	RNF170
	RNF219
	RPA2
	RPL22L1
	RPP30
	RPS27A
	RPS6KA5
	RQCD1
	RRAS2
	SAMHD1
	SAMM50
	SARS
	SCPEP1
	SEL1L
ABHD14B	SEPT1
ACAD11	SEPT15
	SERPINB1
	SET
	SETSIP
	SKA1
	SLC4A7
	SORL1
	SPCS2
	SRL
	ST13
	ST13P4
	ST13P5
	STIM1
	STIM2
	STK39
	STRN3
	STT3B
	SUMF2
	TADA1
	TAF10
	TAF4
	TAF6
	TAF6L
	TBCB
	TCEA1

TGFB1
TMED10
TMED9
TMEM109
TMX1
TRADD
TRMU
TRRAP
TYK2
UBA52
UBB
UBC
UGGT1
USP11
VAC14
VLDLR
VPS33B
VPS51
VPS52
VPS53
VWA8
WDR41
YARS
YEATS4
ZADH2

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei diesem Projekt unterstützt haben. Danke an meine Betreuer Professor Marc Schmidt-Supprian und Arnd Kieser, die immer ein offenes Ohr für mein Projekt und entscheidende Ideen dazu hatten, und mich während der gesamten Zeit des PhD unterstützt haben. Außerdem hatte ich besonders zur zweiten Hälfte der Doktorarbeitszeit das Gefühl sehr eigenständig in meinen Projekten handeln zu können.

Besonderer Dank geht an meinen Mentor Professor Oliver Weigert, der sich nicht nur regelmäßig nachts um 2:00 für mein Projekt eingesetzt hat, sondern auch ein Leben als Wissenschaftler mit Herzblut vorgelebt hat und mich generell bei allem (!) unterstützt hat. Ich denke, dass mir auch daher die Doktorandenzeit als eine sehr gute Zeit in Erinnerung bleiben wird.

Besonders bedanken möchte ich außerdem bei Martina, Verena, Carolin, Louisa, Sarah, Vindi, Johannes, Deepak, Pranav, Quentin, Lukas, Michael und Will. Ihr habt nicht nur entscheidend zu meinem Projekt beigetragen, sondern seid auch Freunde für's Leben geworden. Besonders zu erwähnen ist Michaels Hilfe bei Western Blots, Dosis-Wirkungskurven (keiner bekommt kleinere Fehlerbalken hin), generell immer alles am Laufen zu halten und die Gespräche über unseren gemeinsamen Hobbies. Außerdem geht besonderer Dank an die PhDs Martina und Will, die im selben Boot wie ich saßen und mich immer motiviert haben.

Danke an Verena und Caro, die nicht nur mit ihrer Post-Doc-Expertise die lebenswichtigen Funktionen des Labors (Bioinformatik + Durchflusszytometrie) aufrechterhalten haben, sondern auch die besten Events und Geschenke organisiert haben. Danke an Louisa, Sarah und Johannes, dass ihr mir immer die klinische Relevanz unserer Forschung vor Augen gehalten habt und auch nach Nachtdiensten immer gute Laune verbreitet habt. Danke auch an Vindi, die mir bei der Bioinformatik zur Seite stand.

Danke Quentin, Lukas und Pranav, dass ihr das Labor jung gehalten und mit eurem Charakter und medizinischen Wissen von Anfang an bereichert habt.

Neben der AG Weigert möchte ich auch Bianka Ksienzyk, Dr. Benjamin Tast und Dr. Lisa Richter für Ihre Hilfe bei der Zellsortierung danken. Außerdem möchte ich Josef Mautner für die großartige Zusammenarbeit bei den Co-Kulturexperimenten danken. Weiterhin danke ich dem Labor von Professor Davids am Dana-Farber-Cancer Institute, sowie dem Labor von Professor Louissaint, die mich sehr herzlich in Boston willkommen haben.

Dem gesamten ELLF danke ich für hervorragende, wissenschaftliche Diskussionen, interessante Mittags- und Kaffee-Pausen-Gespräche und die vielen Treffen außerhalb des Labors. Es war eine sehr gute Zeit mit euch!

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt haben. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Freundin Eva bedanken, die mich auch in den stressigeren Phasen der Doktorarbeit immer unterstützt hat und mit der ich auch mein weiteres Leben verbringen möchte.

Ich bin sehr dankbar, euch alle in meinem Leben zu haben.