

Aus dem Centrum für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin (CC 11)
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt für Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte

Direktor: Prof. Dr. med. Gert Baumann

Habilitationsschrift

**Die Bedeutung des Immunoproteasoms in der Pathogenese
der murinen Coxsackievirus B3 Myokarditis**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Dr. med. Antje Voigt

geboren am 25.08.1976

Eingereicht: September 2011

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Scheffner

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	5
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System	5
1.2 Die Rolle des 26S Immunoproteasoms in der Antigenprozessierung	8
1.3 Von der Antigenprozessierung unabhängige Funktionen des Immunoproteasoms	10
1.4 Die virale Myokarditis und Dilatative Kardiomyopathie	11
1.5 Die Molekularbiologie der Coxsackievirus B3-Infektion	13
1.6 Das Mausmodell der Coxsackievirus B3-Myokarditis.....	14
1.7 Übergeordnete Fragestellung.....	17
2. Eigene Arbeiten.....	18
2.1 Das Immunoproteasom wird in der akuten Coxsackievirus B3-Myokarditis vermehrt exprimiert.....	18
2.2 Die Generierung von <i>in silico</i> vorhergesagten Epitopen des Coxsackievirus B3- Polyproteins durch das Proteasom.....	30
2.3 Die Typ I Interferon-vermittelte Induktion des Immunoproteasoms führt zur vermehrten Generierung von Coxsackievirus B3-Epitopen in der akuten Myokarditis.....	44
2.4 Eine eingeschränkte Antigenpräsentationskapazität von dendritischen Zellen geht mit einer schweren Coxsackievirus B3-Myokarditis einher	54
2.5 Das Immunoproteasom reguliert die zelluläre Proteinhomeostase bei Zytokin-induziertem oxidativen Stress.....	63
2.6 Die Funktionseinschränkung des Immunoproteasoms durch $\beta 5i$ /LMP7-Gendeletion führt zu einer schweren Coxsackievirus B3-Myokarditis	76
3. Übergreifende Diskussion und Ausblick.....	90
4. Zusammenfassung	99
5. Literaturangaben aus dem freien Text.....	100
Danksagung	109
Erklärung.....	111

Abkürzungen

ACCF	American Heart Association Councils on Clinical Cardiology
AHA	American Heart Association
ALIS	Aggresome-like structures
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrio-ventrikulär
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxy-ribonucleic acid
CK-MB	Creatinkinase Myokardtyp
CVB3	Coxsackievirus 3
DAF	Decay accelerating factor
DALIS	Dendritic cell aggresome-like structures
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic cell
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DRiP	Defective ribosomal products
EAE	Experimentelle akute Enzephalomyelitis
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP1	ER-Aminopeptidase 1
ESC	European Society of Cardiology
Gly	Glycin
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM	Inter-cellular adhesion molecule
IEDB-AR	Immune epitope database analysis resource
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRES	Internal ribosomal entry site
IRF-1	Interferon regulatory factor 1
ISG15	Interferon stimulated gene 15
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LGE	Late gadolinium enhancement
LLO	Listeriolysin O
LMP	Low molecular weight protein
Mda-5	Melanoma differentiation-associated gene 5
MECL	Multicatalytic endopeptidase complex
Met	Methionin
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonucleic acid

MRT	Magnetresonanztomographie
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK Zelle	Natural killer Zelle
NOD	Non-obese diabetic
NP	Nuclear protein
PA	Proteasom-Aktivator
PCR	Polymerase chain reaction
PSMB	Proteasome subunit beta type
PVB19	Parvovirus B19
RIG-1	Retinoid-inducible gene 1
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Small nucleotide polymorphism
ss	single stranded
TAP	Transporter associated with antigen presentation
Thr	Threonin
TLR	Toll-like receptor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- β
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	Untranslated region
Val	Valin
WHO/ISFC	World Health Organization/International Society and Federation Cardiology

1. Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das zelluläre Proteingleichgewicht setzt einen regulierten und kontrollierten Abbau von endogenen Proteinen voraus. In Situationen, die mit einer gesteigerten Proteinsynthese oder vermehrter Proteinschädigung einhergehen, werden vermehrt nicht-gefaltete und falsch-gefaltete Proteine gebildet. Diese können Zell-schädigend wirken und müssen einem regulierten Abbau in zellulären Kompartimenten zugeführt werden. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) nimmt dabei eine zentrale Rolle ein [1]. Proteine, die an der Zelldifferenzierung, der Zellzyklus-, Transkriptionskontrolle oder Regulation des apoptotischen Zelltods beteiligt sind, werden nach ATP-abhängiger Konjugation mit mehreren Ubiquitinmolekülen durch das 26S Proteasom abgebaut [2]. Aufgrund dieser zentralen Funktion ist das UPS entscheidend an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen aus dem kardiovaskulären [3–5] und neurodegenerativen Kontext [1,6] beteiligt.

Das 26S Proteasom besteht aus dem 19S Regulator-Komplex und dem 20S Proteasom [7,8]. Das 20S Proteasom setzt sich aus vier aneinander gelagerten Ringen zusammen. Eukaryonten weisen zwei Kopien von 14 verschiedenen Untereinheiten auf, die aufgrund ähnlicher Sequenzen α - und β -Untereinheiten zugeordnet sind. Die α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) bilden die beiden äußeren, β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 7$) die beiden inneren Ringe. Durch diese $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ -Anordnung bildet sich ein Zylinder mit drei Hohlräumen. Der innere Hohlraum wird durch die beiden benachbarten β -Ringe, die äußeren Vorkammern werden jeweils durch Anteile eines α - und β -Rings begrenzt [9,10]. Die Architektur des α -Rings ist für den Substrateinlass (*gating*) und das Einschleusen des Substrats an das aktive Zentrum (*channeling*) verantwortlich. Am Beispiel der mutierten $\alpha 3$ -Untereinheit konnte in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass das *gating* und die Wechselwirkung zum 19S Komplex durch die strukturelle Veränderung einer α -Untereinheit beeinflusst wird [11]. Die Prosequenzen der β -Untereinheiten werden am N-Terminus während der Assemblierung und Reifung des Proteasoms autokatalytisch entfernt. So wird der innere Hohlraum frei zugänglich, und die katalytischen Zentren der drei proteolytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ werden aktiviert [12,13].

Proteasom-Komplexe gehören zur Familie der N-terminal nukleophilen Hydrolasen. Der N-terminale Threoninrest der aktiven β -Untereinheiten fungiert als Nukleophil und

Protonenakzeptor bei der Spaltung der Peptidbindung [14]. Bei der Proteolyse durch das Proteasom entstehen hauptsächlich Peptidfragmente mit einer Länge von 4 bis 24 Aminosäuren. Mit Hilfe von fluorogenen Peptidsubstraten konnten den proteolytisch aktiven β -Untereinheiten bestimmte Schnittpräferenzen zugeordnet werden: die $\beta 1$ -Untereinheit weist eine Caspase-ähnliche Aktivität auf und spaltet Peptidbindungen bevorzugt nach sauren Aminosäureresten, $\beta 2$ hydrolysiert die Peptidbindung nach basischen Aminosäuren (Trypsin-ähnliche Aktivität) und $\beta 5$ zeigt eine chymotryptische Aktivität mit einer Schnittpräferenz nach hydrophoben bzw. aromatischen Aminosäuren [15]. Diese Enzymspezifität ist bei physiologischen Substraten jedoch weitaus geringer ausgeprägt [16]. Intakte Proteinsequenzen spaltet das Proteasom bevorzugt nach basischen und hydrophoben Resten [17]. Die jeweilige Schnittpräferenz hängt auch von der umgebenden Aminosäuresequenz ab [18].

In der Zelle werden Proteine über eine komplexe Enzymkaskade mit aktivierenden E1-, konjugierenden E2- und transferierenden E3-Enzymen ubiquitinyliert [19]. Das 26S Proteasom als zentraler proteolytischer Komplex des UPS ist für den ATP-abhängigen Abbau poly-ubiquitinylierter Proteine verantwortlich. 19S Regulator-Komplexe binden poly-ubiquitinylierte Proteine, deubiquitinylieren diese, assistieren bei der Entfaltung der Proteine und schleusen die Proteine in den 20S Kern-Komplex ein. Der 19S Regulator des 26S Proteasoms setzt sich aus bis zu 20 verschiedenen ATPasen und Nicht-ATPasen zusammen, welche wiederum zwei Sub-Komplexe, „base“ und „lid“ genannt, bilden. Die ATPase-Untereinheiten fungieren ähnlich wie molekulare Chaperone. Sie können in ATP-abhängigen Zyklen nicht-gefaltete Proteine und partiell-gefaltete Intermediate stabilisieren und den Zugang in das enzymatisch aktive Zentrum des 20S Proteasoms kontrollieren [20]. Innerhalb des 19S Regulators wurde eine 37kDa Isopeptidase nachgewiesen. Durch deren enzymatische Aktivität können Ubiquitinketten vom jeweiligen Substrat abgespalten, und diese im Zytosol reutilisiert werden [21].

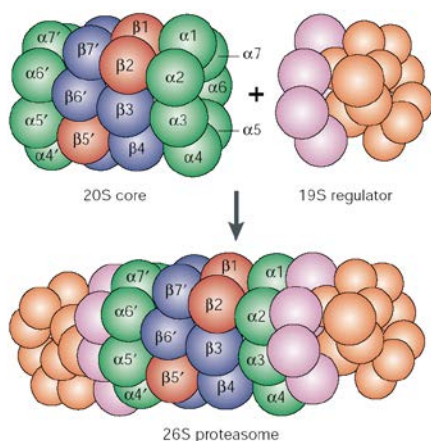


Abb.1: Struktur des 26S Proteasoms. In grün sind die sieben α -Untereinheiten dargestellt, in blau und rot die sieben verschiedenen β -Untereinheiten des 20S Kern-Komplexes. Rot hervorgehobene β -Untereinheiten weisen katalytische Aktivität auf. Die 19S Regulatoren bestehen aus zwei Sub-Komplexen, in orange die neun Nicht-ATPase-Untereinheiten des „lid“-Sub-Komplexes. In violett abgebildet die AAA-ATPase-Untereinheiten, die mit Nicht-ATPasen den „base“-Sub-Komplex bilden (aus [22]).

Der zweite Regulator-Komplex des Proteasoms, PA28 oder 11S Regulator, ist durch Interferone (IFN) induzierbar und wird über die $\alpha 6$ -Untereinheit an das 20S Proteasom gebunden. PA28 beeinflusst *in vitro* den Substrateinlass, die Verweildauer der Substrate im katalytischen Zentrum und die Produktfreisetzung. Zumindest ein Teil des zytosolischen Proteasoms liegt als Hybridproteasom vor, d.h. je ein 19S und ein 11S Komplex sind an ein 20S Proteasom gebunden [23]. PA28 wird in fast allen Zellen exprimiert. Die Bindung von PA28 an das Proteasom kann die Bildung von MHC Klasse I-T Zell-Epitopen positiv beeinflussen [24–27]. Dies wurde für das Melanoma-Differenzierungsantigen TRP₂₃₆₀₋₃₆₈ gezeigt [28]. Diese Auswirkungen von PA28 auf die Epitopgenerierung sind für andere Modell-Antigene nicht nachvollziehbar. PA28 scheint in der Antigenprozessierung insgesamt eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In Organen des lymphatischen Systems wie Thymus, Milz und Lymphknoten ist das Proteasom durch alternative katalytisch aktive Untereinheiten charakterisiert: hier dominieren die Immununtereinheiten $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL-1 und $\beta 5i$ /LMP7. Die beiden Untereinheiten $\beta 1i$ /LMP2 und $\beta 5i$ /LMP7 sind in der MHC Klasse II-Region kodiert. Dadurch hat sich ursprünglich die Namensgebung „Immununtereinheiten“ und „Immunoproteasom“ ergeben [29]. Das Immunoproteasom weist einen erhöhten Substratumsatz und eine veränderte Schnittpräferenz auf [17,30]. Professionell Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie dendritische Zellen (DC) exprimieren bereits im unreifen Zustand diese Immununtereinheiten [24]. Durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine/IFN werden in einer systemischen Entzündung diese Immununtereinheiten auch in Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs induziert, und das 26S Immunoproteasom wird *de novo* gebildet [31]. Bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder mit Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) konnte ein Austausch von konstitutiven Untereinheiten mit Immununtereinheiten in der Leber infizierter Mäuse nachgewiesen werden [32,33].

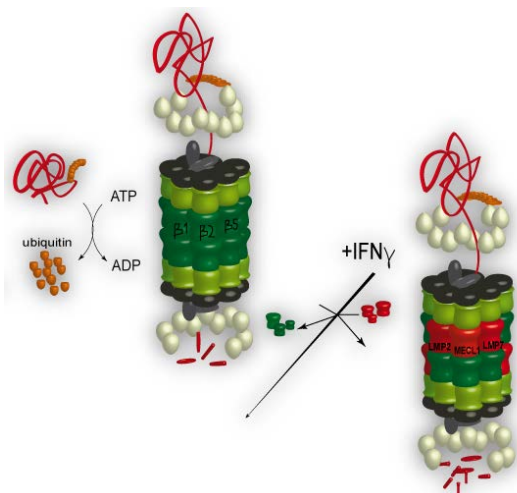


Abb.2: Proteinabbau durch das 26S Proteasom.

Nach Modifikation mit Poly-Ubiquitin-Molekülen werden die Substrate vom 26S Proteasom erkannt, de-ubiquitinyliert und vom Proteasom degradiert. Durch IFN werden die Immununtereinheiten $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL-1 und $\beta 5i$ /LMP7 induziert und das 26S Immunoproteasom *de novo* gebildet.

1.2 Die Rolle des 26S Immunoproteasoms in der Antigenprozessierung

Untersuchungen zur Wirkung spezifischer Proteasom-Inhibitoren gaben den entscheidenden Hinweis, dass das Proteasom maßgeblich an der Generierung von MHC Klasse I-Epitopen beteiligt ist. Die Hemmung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms führte zu einer deutlichen Reduktion der Präsentation von MHC Klasse I-Epitopen auf der Zelloberfläche [34]. Das Immunoproteasom generiert präferenziell C-terminale Schnitte nach hydrophoben und basischen Aminosäuren. Diese Schnittpräferenz passt zum C-terminalen Ankerrest zur optimalen Bindung in die MHC Klasse I-Tasche.

Fehlerhafte Translationsprodukte, sog. *defective ribosomal products (DRiP)*, stellen eine wichtige Quelle viraler MHC Klasse I-Epitope dar [35,36]. Die Hauptfraktion der neu synthetisierten Proteine wird poly-ubiquityliert und innerhalb weniger Minuten nach Synthese durch das UPS abgebaut. Im Anschluss an die Peptid-Generierung durch das Proteasom werden die Fragmente jedoch größtenteils durch Peptidasen im Zytosol zerstört, so dass etwa nur 1% der durch das Proteasom generierten Peptide zur Präsentation an die Zelloberfläche gelangen [37]. Davon weist nur eine geringe Anzahl der Fragmente die zur optimalen Bindung in die MHC Klasse I-Bindungstasche passende Größe von 8-10 Aminosäuren auf [16]. Die größere Peptidfraktion ist für die Bindung an MHC Klasse I-Moleküle zu lang und muss daher durch Peptidasen im Zytosol oder ER auf die korrekte Länge *getrimmt* werden [16]. Der Transport der Peptide in das Endoplasmatische Retikulum (ER) erfolgt über *transporter associated with antigen processing (TAP)*. Im ER werden *Precursor*-Peptide durch ER-Aminopeptidasen (ERAP1 und ERAP2) weiter *getrimmt*. Hier können Epitope direkt an neu synthetisierte MHC Klasse I-Moleküle binden [38]. Diese Peptid-beladenen MHC Klasse I-Moleküle werden dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche zur Präsentation an CD8⁺ T Zellen transportiert.

Ausführliche Untersuchungen der MHC Klasse I-Epitop-Generierung durch das Proteasom haben gezeigt, dass sowohl das Standard- als auch das Immunoproteasom antigene MHC Klasse I-Epitope generieren kann. Für einzelne Epitope kann sich dabei die Effizienz der Peptidhydrolyse durch das Standard- und Immunoproteasom deutlich unterscheiden. Die IFN- γ induzierte Expression des Immunoproteasoms ist entscheidend für die Präsentation des Hepatitis B Virus Epitops HBVcAg₁₄₁₋₁₅₁ [39] und die Prozessierung eines vom Mage-3 Protein entstammenden Tumorepitops [40]. Im Gegensatz dazu weist das Immunoproteasom im Vergleich zum Standardproteasom eine deutlich reduzierte Generierungsrate des Melanoma-

Differenzierungsantigens Melan-A₂₆₋₃₅ auf [41]. Gegenstand aktueller Diskussionen ist die Frage, inwiefern sich die Peptidgenerierung durch das Standard- und Immunoproteasom unterscheidet. Das Immunoproteasom kann ein qualitativ differierendes Muster an antigenen Peptiden durch alternative Schnittstellen-Präferenzen generieren. Andererseits kann es durch den gesteigerten Substratumsatz durch das Immunoproteasom zu einer quantitativen Änderung der Peptidmenge kommen [42]. Das Immunoproteasom generiert beispielsweise das Adenovirus E1B₁₉₂₋₂₀₀ Epitop effizienter als das Standardproteasom. Gleichzeitig kann aber auch das Standardproteasom dieses Fragment generieren, allerdings in einer reduzierten Menge [43].

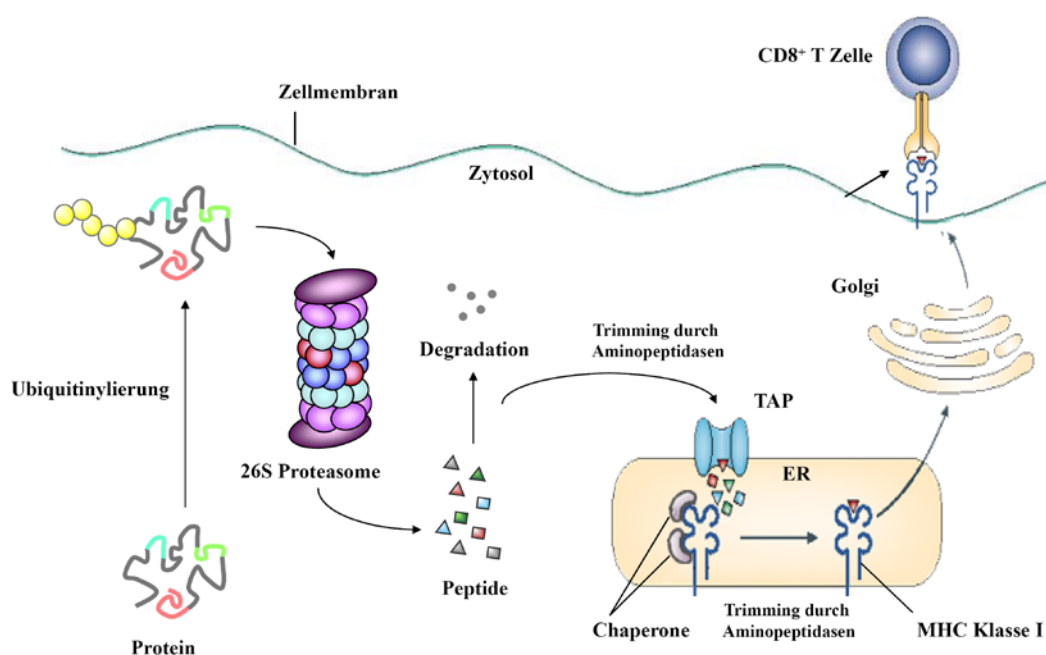


Abb.3: MHC Klasse I-Antigenprozessierung.

Das Proteasom generiert Peptide mit dem für die Verankerung in der MHC Klasse I-Bindungstasche passenden C-Terminus. *Precursor*-Peptide weisen N-terminal Aminosäuren auf, die entweder im Zytosol oder im ER weiter prozessiert (*getrimmt*) werden. Antigen Peptide werden via TAP-Transporter in das ER transportiert und dort an MHC Klasse I-Moleküle gebunden. Diese Peptid-beladenen Komplexe werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und können so eine spezifische CD8⁺ T Zell-Antwort initiieren (modifiziert aus [44]).

Zur Klärung der Frage, welche Rolle das Immunoproteasom in der Peptidgenerierung spielt, werden *in vitro* Prozessierungsfragmente mit der Massenspektrometrie untersucht. Experimente mit Epitop-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T Zellen sind für die Analyse der *in vivo* Bedeutung einer Epitopgenerierung durch das Immunoproteasom besser geeignet. Der *in vitro* Nachweis einer gesteigerten Antigenpräsentation erlaubt jedoch nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf die *in vivo* Relevanz dieser Beobachtung. Für das *Listeria monocytogenes* Epitop Listeriolysin O

(LLO)₂₉₆₋₃₀₄ konnte gezeigt werden, dass dieses Epitops durch die vermehrte Expression des Immunoproteasoms in der Leber infizierter Mäuse effizienter generiert wird. Dies hatte keinen Effekt auf die Anzahl der Epitop-spezifischen CD8⁺ T Zellen [32]. In einem LCMV-Infektionsmodell konnte eine erhöhte Immunoproteasom-Expression in der Leber [33] sowie eine gesteigerte Epitopgenerierung des immuno-dominanten LCMV NP118 Epitops nachgewiesen werden [45]. Eine Immunoproteasom-Defizienz hatte jedoch keinen Einfluss auf die Frequenz LCMV-Epitop-spezifischer CD8⁺ T Zellen und die Viruslast in LCMV-infizierten Mäusen [46]. Im Influenzavirus-Infektionsmodell wurde gezeigt, dass das Immunoproteasom die Hierarchie einzelner MHC Klasse I-Epitope beeinflussen kann [47]. Die Effekte des Immunoproteasoms auf die Antigenprozessierung scheinen Epitop-spezifischer Natur zu sein.

1.3 Von der Antigenprozessierung unabhängige Funktionen des Immunoproteasoms

Die Hauptfunktion des Proteasoms liegt im Abbau defekter, poly-ubiquitinylierter Proteine. Bisherige Experimente untersuchten die Rolle des Immunoproteasoms bei der Antigenprozessierung und der CD8⁺ T Zell-vermittelten Immunantwort. Analysen in Immununtereinheiten-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass das Immunoproteasom auch einen Einfluss auf die Expansion und Lebensdauer von Lymphozyten haben kann [47,48]. Immununtereinheiten sind auch an der T Zell-Proliferation beteiligt [49–51]. Die verminderte Zahl reifer B Zellen und CD4⁺ T Zellen in β 1i/LMP2-defizienten Mäusen war mit Effekten auf die humorale Immunantwort vergesellschaftet: hier wurde ein verminderter Isotypwechsel von Antikörpern gegen Influenzavirus beobachtet [48]. Diese verschiedenen Befunde legen den Schluss nahe, dass das Immunoproteasom anderweitige, über die durch IFN- γ -stimulierbare Antigenprozessierung hinaus gehende Funktionen aufweist. Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen der Immunoproteasom-Expression und der Regulierung der Zytokinantwort diskutiert [52,53]. Wie im Knochenmarkschimären-Modell der β 5i/LMP7+ β 2i/MECL-1-defizienten Maus gezeigt, schützen die Immununtereinheiten des Proteasoms das durch Entzündung und Zelltod geschädigte Gewebe vor einer durch Strahlenschäden induzierten autoimmunen CD8⁺ T Zell-Antwort [54]. Beim Mensch wurden zwei Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms (SNP)*) in der β 5i/LMP7-kodierenden Sequenz identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für das Entstehen des autoimmunen Typ I Diabetes mellitus assoziiert sind [54]. Eine ähnliche Korrelation zwischen dem funktionellen Defekt einzelner Immununtereinheiten, hier die β 1i/LMP2 Untereinheit, und dem Auftreten eines Typ I Diabetes mellitus wurde in *non*

obese diabetic (NOD) Mäusen nachgewiesen. Die Funktionseinschränkung der Immunoproteasom-Aktivität in Splenozyten von NOD-Mäusen [55], aber auch in B Lymphozyten aus $\beta 1i$ /LMP2-defizienten Mäusen [48] und in murinen embryonalen Fibroblasten aus $\beta 5i$ /LMP7-defizienten Mäusen [53] führt zu einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die grundlegende physiologische Rolle des differierenden Prozessierungsverhaltens des Standard- und Immunoproteasoms scheint komplexer Natur zu sein und ist letztlich nicht geklärt.

1.4 Die virale Myokarditis und Dilatative Kardiomyopathie

Die Myokarditis ist ein entzündlicher Prozess des Herzmuskels, der akut, subakut oder chronisch auftritt und ein fokales oder diffuses Verteilungsmuster aufweist [56]. In der westlichen Welt sind Infektionen mit kardiotropen Viren Hauptauslöser einer Myokarditis. Das Spektrum kardiotroper Viren hat sich in den letzten Jahren gewandelt. Während in den letzten beiden Jahrzehnten Entero- und Adenoviren dominierten [57,58], werden derzeit vor allem Parvovirus B19 (PVB19), Herpesvirus 6 (HHV6) und Hepatitis C Virus (HCV) in Endomyokardbiopsien von Patienten mit einer akuten Myokarditis nachgewiesen [59,60]. Zuverlässige Daten zur Prävalenz der Myokarditis sind aufgrund differierender diagnostischer Methoden in den verschiedenen Zentren kaum verfügbar. Aus zwei Analysen liegen dazu nähere Informationen vor. Bei Patienten, die an einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) leiden und Patienten mit einer Herzinsuffizienz unklarer Ätiologie, die im *Myocarditis Treatment Trial* eingeschlossen wurden, lag die Prävalenz der Myokarditis bei 9-10% [61,62]. Die klinische Diagnosestellung ist durch das sehr variable Krankheitsbild erschwert. Eine Herzinsuffizienz kann wie angedeutet Ausdruck einer Myokarditis sein. Dabei kann ein fulminantes Entzündungsgeschehen zu einer akuten Herzinsuffizienz bis hin zum kardiogenen Schock führen. Thoraxschmerzen können bei kombiniertem Befall des Perikards oder durch lokale Koronarspasmen bedingt auf eine Myokarditis hindeuten [63]. Auch tachykarde Rhythmusstörungen wie z.B. ventrikuläre Tachykardien und bradykarde Rhythmusstörungen wie AV-Blockierungen können durch eine Myokarditis verursacht werden [56]. Generell sollte bei Patienten mit den genannten klinischen Symptomen und einer kürzlich stattgehabten Infektion des Respirations- oder Gastrointestinaltrakts eine Myokarditis in Betracht gezogen werden.

Folgende Untersuchungsmethoden können bei der Diagnosestellung hilfreich sein: Das 12-Kanal-Oberflächen-EKG kann ubiquitär Repolarisations- und/oder Rhythmusstörungen aufzeigen [64]. Laborchemische Veränderungen von kardialen Markern wie Troponin I oder

Kreatinkinase-MB (CK-MB) können auf eine Myokardnekrose hindeuten [65]. Die Echokardiographie zeigt variable Befunde. Sie ist für die differenzialdiagnostische Betrachtung zum Ausschluss anderer spezifischer Kardiomyopathien hilfreich. Durch die Weiterentwicklung des kardialen MRT wurden in den letzten Jahren deutliche Fortschritte in der non-invasiven Diagnostik der akuten Myokarditis erzielt. Mittels eines kombinierten Verfahrens, das T2-Signalintensitäten, das globale myokardiale Kontrast-Enhancement im Vergleich zum Skelettmuskel in der T1-Wichtung und das *late gadolinium enhancement (LGE)* analysiert, kann eine Myokarditis mit einer Sensitivität von 76% und einer Spezifität von 96% diagnostiziert werden [66]. Eine nach diesen Kriterien klinisch wahrscheinliche Myokarditis kann letztendlich nur mit Hilfe einer Endomyokardbiopsie diagnostiziert werden, bzw. es können andere in Frage kommende Erkrankungen so ausgeschlossen werden. Ein Konsensusschreiben der AHA/ACCF/ESC aus dem Jahre 2007 kommentiert dazu anhand von 12 klinischen Szenarien die Indikation zur Endomyokardbiopsie [67]. Grundlage in der Diagnostik der Myokarditis sind histologische Analysen, die in den Dallas-Kriterien zusammengefasst sind. Eine Myokarditis wird als Myokardnekrose mit Nachweis eines entzündlichen Infiltrats definiert [68]. Diese Kriterien werden kontrovers diskutiert. Insbesondere der *sampling error* bei der Endomyokardbiopsie zieht bei Anwendung dieser Kriterien erhebliche Limitationen in der korrekten Diagnosestellung nach sich. Die WHO/ISFC *Task Force* zur Evaluation einer Myokarditis fordert daher neben der klassischen Histologie auch verschiedene immunhistologische und molekularbiologische Analysen. So können kardiotope Viren identifiziert werden. Mit Markern wie CD3, CD68, HLA-Klasse II und ICAM-1 kann eine myokardiale Inflammation genauer charakterisiert werden. Bei Nachweis von mindestens 14 T Lymphozyten und/oder Makrophagen/mm² Gesichtsfeld wird von einem entzündlichen Infiltrat gesprochen [69].

Die Mehrzahl der Patienten mit einer akuten lymphozytären Virusmyokarditis weist einen unkomplizierten Verlauf auf. In anderen Fällen kann eine Virusmyokarditis ätiologisch mit der Entwicklung der DCM in Zusammenhang stehen. Die DCM ist durch Dilatation und Einschränkung der kontraktile Funktion eines oder beider Ventrikel definiert [69]. Mit einer Prävalenz von 36 pro 100.000 stellt die DCM neben der ischämischen Kardiomyopathie die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz und eines plötzlichen Herztods dar. Die Mehrzahl der Erkenntnisse über den Verlauf einer akuten Virusmyokarditis bis hin zur chronischen Kardiomyopathie basiert auf Untersuchungen im Mausmodell der experimentellen Coxsackievirus B3 (CVB3)-Myokarditis [70]. Ätiopathogenetisch werden dabei neben der

direkten Zellschädigung durch zytolytische Viren auch immunpathologische Faktoren infolge einer Perforin-vermittelten Zell-Lyse diskutiert. In der adaptiven Phase der Immunantwort werden humorale und zelluläre autoreaktive Prozesse gegen myokardiale Proteine ausgelöst. Diese Autoimmunantwort kann zu einer chronischen Herzmuskelschädigung nach der Myokarditis führen [71]. Darüber hinaus weisen Daten aus dem Mausmodell der CVB3-Myokarditis darauf hin, dass eine Viruspersistenz auch bei restringierter Virusreplikation nach Ablauf der akuten Myokarditis einen chronischen Myokardschaden verursachen kann [72]. Bei Patienten mit dem klinischen Bild einer DCM und dem histologischen Ausschluss einer aktiven Myokarditis wurden in 67% der Fälle kardiotope Viren in der PCR nachgewiesen [73]. Patienten mit dem Nachweis einer Viruspersistenz im Herz wiesen im Vergleich zu Patienten, bei denen es im Verlauf der Erkrankung zu einer Viruselimination gekommen war, eine reduzierte linksventrikuläre systolische Funktion auf [74]. Diese Befunde legen einen Zusammenhang zwischen der akuten Virusmyokarditis und einer DCM auch im Mensch nahe.

1.5 Die Molekularbiologie der Coxsackievirus B3-Infektion

Das Coxsackievirus B3 ist als kardiotropes Virus entscheidend an der Pathogenese der akuten Virusmyokarditis DCM beteiligt. Coxsackieviren können auch Auslöser einer Meningitis, Pankreatitis, respiratorischer Infekte und diverser Hauterkrankungen wie der Hand-Fuß-Mund-Krankheit sein. Die überwiegende Mehrzahl der CVB3-Infektionen verläuft allerdings asymptomatisch [70].

Coxsackieviren sind unbehüllte, einzelsträngige RNA-Enteroviren, die zur Familie der Picornaviren gehören. Das 7.4kB große Genom in Form einer positiven Einzelstrang-RNA (+ssRNA) wird von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen. Das Virus tritt über zwei Rezeptoren in die Zelle ein. Zunächst bindet das CVB3 an das Membranprotein *decay-accelerating factor* (DAF, CD55) und induziert damit eine komplexe Signaltransduktionskaskade. Dies führt zur Aktin-Polymerisation und Virus-Internalisation nach Bindung des Virus an den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) [75]. Die Expression von CAR ist in Mäusen mit steigendem Lebensalter rückläufig. Beim Mensch ist im Alter eine Abnahme der CVB3-Infektionen zu verzeichnen, die mit der verminderten CAR-Expression zu korrelieren scheint [76]. Die einzelsträngige CVB3-RNA kodiert für einen *open reading frame*. Am 5'-Ende befindet sich das VPg Protein, das analog des für Eukaryonten typischen 7-Methylguanosin-*cap* für die Initiierung der viralen Proteintranslation von Bedeutung ist. Die Translation des CVB3-Polyproteins wird über die *internal ribosomal entry site* (IRES) ausgelöst

und läuft damit *cap*-unabhängig ab [77]. Die Virusproteasen 2A^{pro} und 3C^{pro} schneiden das Polyprotein in die drei Vorläuferproteine P1, P2 und P3. Aus dem Vorläuferprotein P1 entstehen mit Hilfe der Protease 3C^{pro} die Kapsidproteine VP1, VP2, VP3 und VP4; aus den Vorläuferproteinen P2 und P3 werden weitere Proteasen und die RNA-Polymerase 3D^{pol} gebildet [78]. Die RNA-Polymerase 3D^{pol} unterstützt die Transkription eines komplementären Minusstrangs aus der viralen Plusstrang-RNA. Dieser Minusstrang dient als Vorlage für die Amplifikation des CVB3-Genoms [79]. Die Plusstrang-RNA bildet mit *de novo* synthetisierten Kapsidproteinen infektiöse Viruspartikel, die nach Zytolyse freigesetzt werden und anschließend andere Zellen infizieren können.

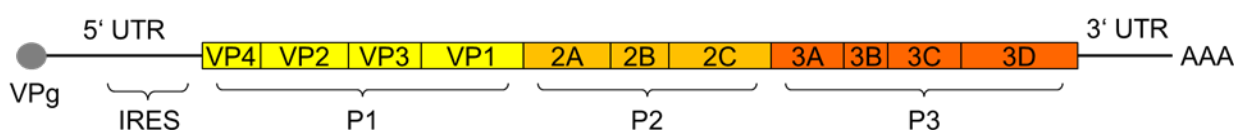


Abb. 4: Struktur des CVB3-Genoms.

Die 5' und 3' *untranslated regions* (UTR) flankieren das CVB3-Polyprotein und werden durch die viralen Proteasen 2A und 3C nach der Translation abgespalten. Die Kapsidproteine (P1) und nicht-strukturellen Proteine (P2, P3) werden durch Autoproteolyse bzw. virale Proteasen prozessiert. *IRES*: *internal ribosomal entry side*. (modifiziert nach [70]).

Tabelle 1: Die Funktionen von CVB3-Proteinen (modifiziert nach [70])

Vorläuferprotein	Protein	Funktion
P1	VP1-VP4	Kapsidproteine
P2	2A ^{pro}	Interferenz mit Wirtszelltranslation und -transkription, Induktion von Apoptose, Beeinträchtigung der Funktion des Zytoskeletts, Proteolyse des CVB3
	2B	Erhöhung der Zellmembranpermeabilität
P3	3A	Inhibition der Wirtszellsekretion
	3B	VPg: Initiierung der Translation, Primerfunktion für + und - ssRNA
	3C ^{pro}	Inhibition zellulärer Transkriptionsfaktoren
	3D ^{pol}	RNA-abhängige RNA-Polymerase, Initiierung der Transkription

1.6 Das Mausmodell der Coxsackievirus B3-Myokarditis

Die experimentelle CVB3-Myokarditis spiegelt den humanen Krankheitsverlauf der Myokarditis von der akuten bis hin zur chronischen Phase in der Maus gut wider [70]. In resistenten Mausstämmen wie C57BL/6 oder DBA/1J löst das CVB3 eine milde akute Myokarditis aus.

Nach 28 Tagen ist hier keine Virusnachweis mehr zu führen. Die Entzündung heilt in diesen Mäusen ohne relevanten Restschaden komplett aus. Im Gegensatz dazu zeigt sich in suszeptiblen Mausstämmen wie A.BY/SnJ oder SWR/J eine massive akute Entzündungsreaktion mit einer hohen Viruslast. Zum Zeitpunkt der chronischen Phase ist hier eine Viruspersistenz nachweisbar. Außerdem sind chronische Entzündungsherde und eine ausgeprägte Fibrosierung sichtbar [72].

Die Untersuchungen dieser verschiedenen Mausstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund waren Grundlage, drei Phasen der Enterovirus-Myokarditis zu charakterisieren. In der früh-akuten Phase um Tag 4 *post infectionem* (p.i.) kommt es zu einer Virus-induzierten Zellschädigung durch Apoptose und Nekrose, zur Vakuolisierung und gleichzeitigen lokalen Kalzifizierung [70]. Hier kann bereits eine erhöhte Expression der Zytokine IL-1 β , IL-2, TNF- α , TNF- β , IL-6 und IFN- γ festgestellt werden [80]. Zu diesem Zeitpunkt sind Entzündungszellen nur vereinzelt nachweisbar [72]. Über *toll-like receptors* (TLR) wird die Typ I IFN-Antwort induziert. Diese ist für die Viruselimination entscheidend [81,82]. Später wandern Antigen-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten, Makrophagen, B Lymphozyten und NK Zellen in das infizierte Myokard ein. Es bilden sich multifokal Entzündungsherde in Regionen infizierter Kardiomyozyten. In diesen Arealen werden pro-inflammatorische Zytokine sezerniert. Es kommt zur verstärkten MHC Klasse I-Expression in infizierten Kardiomyozyten [83]. Die chronische Phase der Myokarditis zwischen Tag 15-90 p.i. ist in suszeptiblen Mäusen durch eine Persistenz viraler RNA und Kapsidproteine charakterisiert [72]. In Arealen infizierter Kardiomyozyten lassen sich hier wie beschrieben Inflammationszellen nachweisen. Virusreplikation und Entzündung werden mit der chronischen Störung der Myokardtextur mit fibrotischem Gewebeumbau und letztlich dem Bild einer DCM ursächlich in Zusammenhang gebracht [70,84].

Die folgenden drei Aspekte können zur Pathogenese der Myokarditis beitragen: 1. die Destruktion der Kardiomyozyten durch einwandernde Immunzellen auch über das Maß der Viruselimination hinaus, 2. die Induktion einer auto-reaktiven Immunantwort gegen kardiiale Strukturen und 3. der unmittelbare Kardiomyozytenschaden durch das Virus selbst [70]. Die Auswirkungen der zellulären und humoralen Immunantwort auf das infizierte Myokard und möglicherweise auch auf nicht-infizierte benachbarte Kardiomyozyten sind in Abb. 5 zusammengefasst. Obwohl immunpathologische Effekte für einzelne Komponenten der Immunabwehr im Tierexperiment nachgewiesen werden konnten [70], blieben letztlich alle immunsuppressiven Therapieansätze in der Myokarditis beim Mensch ohne Erfolg [85]. In

Studien werden gegenwärtig immunologische Therapieansätze untersucht, die auf einzelne Komponenten der Immunabwehr wie spezifische TLR oder die B-Zellantwort abzielen.

Der Virus-vermittelte Zellschaden in der CVB3-Infektion führt zur Freisetzung kardialer antigener Epitope, die sonst dem Immunsystem verborgen sind [86]. Auch über molekulare Mimikry kann eine anti-kardiale Autoimmunität in der CVB3-Infektion induziert werden [87]. In der murinen CVB3-Myokarditis konnten Autoantikörper gegen die schwere Kette des Myosins, gegen Tropomyosin, Desmin und Aktin nachgewiesen werden [71]. Bei der Ausbildung der chronischen Myokarditis im CVB3-Mausmodell ist der Einfluss einer antikardialen Autoimmunität sehr wahrscheinlich. Auch beim Mensch wurden Autoantikörper gegen CVB3 nachgewiesen, die mit kardialen Zielstrukturen kreuz reagieren [88]. Viele Studien sprechen hier für einen Zusammenhang zwischen einer initialen Virusinfektion des Herzens und der Induktion einer antikardialen Autoimmunität [89,90].

Der Beitrag der Virus-vermittelten Destruktion der Kardiomyozyten an der Pathogenese der Myokarditis wird durch Untersuchungen untermauert, die zeigen, dass die Virusreplikation zum Absterben von Kardiomyozyten führt. Infizierte Kardiomyozyten weisen bereits einen relevanten Zellschaden auf, bevor Entzündungszellen in das Herz einwandern [70]. Die Expression einer Replikations-defizienten CVB3 cDNA hatte einen Kardiomyozytenschaden und einen fibrotischen Umbau im Herz zur Folge [81]. Die zytopathischen Viruseffekte werden durch die Virusprotease 2A-abhängige Spaltung des zellulären Dystrophins verstärkt [91]. In der CVB3-Infektion wird die Wirtszell-RNA-Transkription und -Proteintranslation zugunsten der Virusreplikation inaktiviert. In späteren Infektionsphasen werden Apoptosewege induziert, so dass vielfältige Mechanismen durch das CVB3 selbst ausgelöst zum direkten Kardiomyozytenschaden und damit zur Funktionseinschränkung in der akuten Myokarditis führen [70].

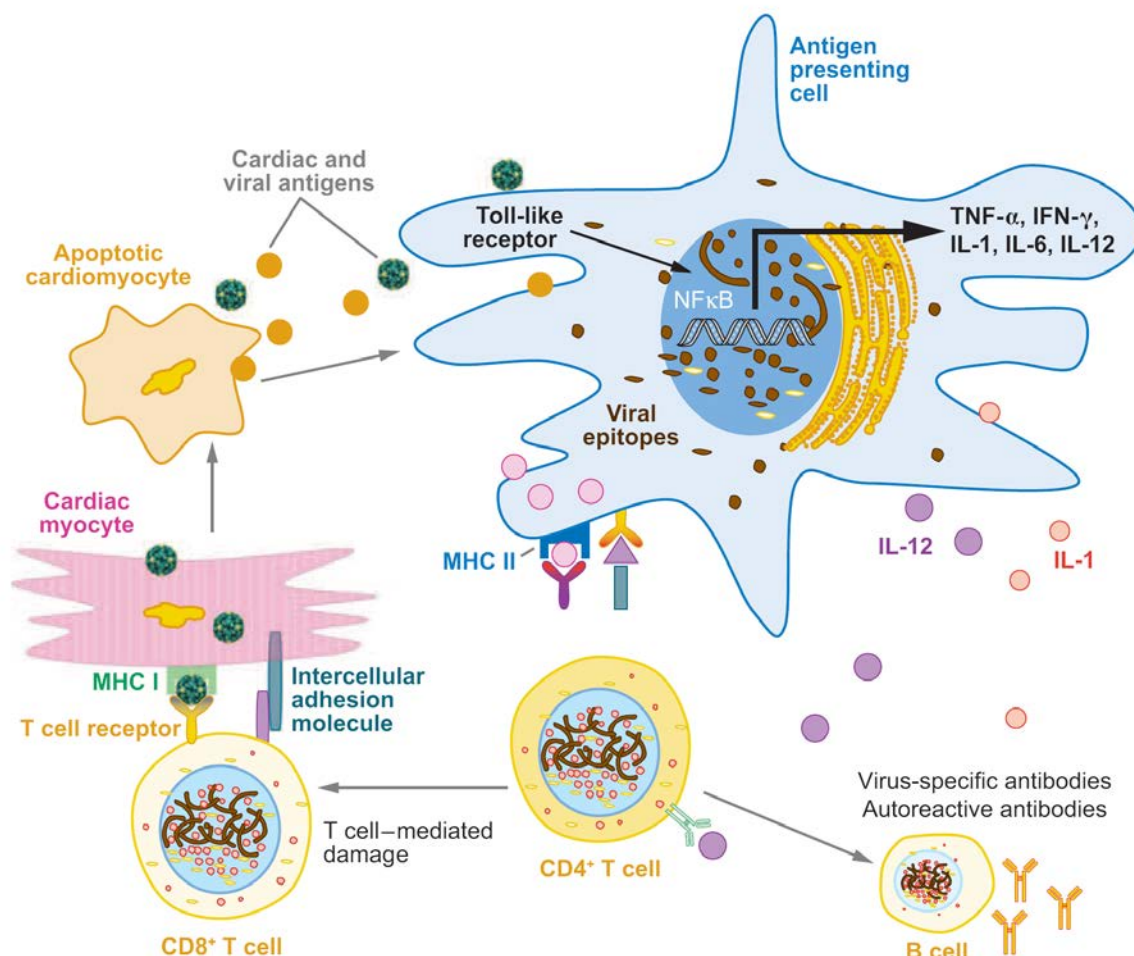


Abb. 5: Myokardschaden durch die Immunantwort in der viralen Myokarditis.

In der Frühphase der akuten Virusmyokarditis kommt es zur Aktivierung der naiven Immunantwort über *TLR* in professionellen APZ und zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Antagenspezifische T Zellen werden *geprimt* und wandern zusammen mit Makrophagen, NK Zellen und B Zellen in das infizierte Myokard ein. Durch die Zerstörung infizierter Kardiomyozyten werden kardiale Autoantigene frei, die die Bildung von Autoantikörpern induzieren können.

1.7 Übergeordnete Fragestellung

Die Bedeutung des UPS im kardiovaskulären Kontext ist in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Trotz der weitreichend bekannten Funktion des UPS und speziell des Immunoproteasoms in Infektionserkrankungen ist dieses System in der Myokarditis bislang nicht untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Immunoproteasoms im Mausmodell der akuten CVB3-Myokarditis zu charakterisieren.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Das Immunoproteasom wird in der akuten Coxsackievirus B3-Myokarditis vermehrt exprimiert

CVB3-Infektionen sind häufige Auslöser einer Myokarditis [70]. Das Mausmodell der akuten und chronischen CVB3-Myokarditis kann zur Charakterisierung von Suszeptibilitätsfaktoren, die zur Viruspersistenz und damit zum chronischen Krankheitsverlauf prädestinieren, herangezogen werden [72]. Dadurch können Rückschlüsse auf das Krankheitsbild der akuten Virusmyokarditis und der sich daraus entwickelnden DCM beim Mensch gezogen werden.

Ziel unserer initialen Analysen war es, mit Hilfe von mRNA-Transkriptomanalysen im Herz differenziell regulierte Gene in der CVB3-Myokarditis zu identifizieren. In der akuten Krankheitsphase zeigte sich eine vermehrte Expression von Genen, die direkt mit der MHC Klasse I-Antigenpräsentation assoziiert sind wie MHC Klasse I-Moleküle, TAP-Peptidtransporter, Tapasin sowie die durch IFN-induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms. Unser weiterer Fokus lag auf der Expression der drei Immununtereinheiten $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL-1$ und $\beta 5i/LMP7$ im Herz. In der Myokarditis zeigte sich in Kardiomyozyten eine verstärkte Expression des Immunoproteasoms sowohl in C57BL/6 als auch in A.BY/SnJ Mäusen. Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen zeichnete sich in suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen eine verstärkte Induktion der Immununtereinheiten an Tag 8 p.i. ab. Zur Klärung der Frage, ob diese gen-regulatorischen Veränderungen auch in einer veränderten Komposition und damit Funktion des Proteasoms münden würden, wurde das 20S Proteasom aus dem Herz infizierter Mäuse isoliert und strukturell charakterisiert. Wir konnten nachweisen, dass alle drei Immununtereinheiten in den kardialen 20S Proteasom-Komplex in C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen in der akuten Phase der Myokarditis inkorporiert waren. Die vergleichsweise erhöhte myokardiale Expression des Immunoproteasoms in A.BY/SnJ Mäusen wurde zu diesem Zeitpunkt auf Proteinebene bestätigt. Zusammenfassend haben wir hier erstmals nachweisen können, dass das Immunoproteasom in der akuten Virusinfektion im Herz gebildet wird [92].

Szalay G*, Meiners S*, Voigt A*, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K, Kandolf R. *Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes*. American Journal of Pathology, 2006; 168:1542-1552.

Seite 19-29

2.2 Die Generierung von in silico vorhergesagten Epitopen des Coxsackievirus B3-Polyproteins durch das Proteasom

In verschiedenen Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass die CD8⁺ T Zell-vermittelte Immunantwort einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der CVB3-Myokarditis nimmt [93,94]. Um einen potenziell vorhandenen Effekt der Immunoproteasom-Regulation auf die Generierung von antigenen MHC Klasse I-Liganden in der CVB3-Myokarditis analysieren zu können, haben wir unseren Fokus zunächst auf die Identifizierung dieser Liganden aus dem CVB3-Polyprotein gelegt. CVB3-Epitope waren bislang nicht bekannt.

Die Frage, ob ein virales Peptid in der Tat *in vivo* als MHC Klasse I-Epitop präsentiert wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Virale Peptide werden überwiegend durch das Proteasom aus dem DRiP-Pool generiert. Anschließend werden diese Peptide über TAP-Peptidtransporter ins ER transportiert. Somit entscheiden Schnittpräferenzen des Proteasoms und Bindungseigenschaften von TAP, ob ein Peptid als antigenes Epitop in Frage kommt. Darüber hinaus sind die Affinität der Peptide zu MHC Klasse I-Molekülen und letztlich die Stabilität dieser Peptid-beladenen Komplexe für die Antigenpräsentation entscheidend. In der *in silico* Peptidvorhersage wird die Komplexität dieser verschiedenen Aspekte durch Computer-basierte Vorhersageprogramme derzeit am besten abgebildet. Zur Identifizierung von MHC Klasse I-Liganden des CVB3-Polyproteins wurden verschiedene Datenbanken eingesetzt. SYFPEITHI analysiert die MHC Klasse I-Affinität/Stabilität eines Peptids [95]; die *immune epitope database analysis resource (IEDB-AR)* kann zusätzlich eine Aussage über die TAP-Bindung einzelner Peptide liefern und sagt die Wahrscheinlichkeit einer Peptidgenerierung durch das Proteasom voraus [96,97]. Mit diesen Programmen wurden 13 H-2^b restringierte CVB3-Peptide vorhergesagt, die in Prozessierungsstudien auf ihre Generierung durch das 20S Proteasom getestet wurden. Insgesamt wurden sieben Epitope bzw. Vorläuferpeptide der insgesamt 13 *in silico* vorhergesagten MHC Klasse I-Liganden durch den 20S Kern-Komplex generiert. Dabei konnte für das CVB3 VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎-Epitop eine Immunoproteasom-abhängige Prozessierung gezeigt werden. Die MHC Klasse I-Bindungsaffinität dieses Liganden wurde *in vitro* als hoch-affin charakterisiert. Zudem konnten wir CVB3 VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎-spezifische CD8⁺ T Zellen *ex vivo* nach CVB3-Infektion nachweisen [98]. Die Identifizierung von durch das Proteasom generierten MHC Klasse I-Liganden des CVB3-Proteins erlaubte uns, in folgenden Experimenten den Effekt der myokardialen Immunoproteasom-Expression auf die Generierung dieser Peptide in der CVB3-Myokarditis zu untersuchen.

Voigt A, Jaekel S, Textoris-Taube K, Keller C, Drung I, Szalay G, Klingel K, Henklein P, Stangl K, Kloetzel PM, Kuckelkorn U. *Generation of in silico predicted Coxsackievirus B3-derived MHC class I epitopes by proteasomes*. *Amino Acids*, 2010; 39:243-255.

Seite 31-43

2.3 Die Typ I Interferon-vermittelte Induktion des Immunoproteasoms führt zur vermehrten Generierung von Coxsackievirus B3-Epitopen in der akuten Myokarditis

IFN- γ induziert die Expression der Immununtereinheiten β 1i/LMP2, β 2i/MECL-1 und β 5i/LMP7 des Proteasoms [22]. Viren lösen im Wirtsorganismus in der Frühphase der Immunantwort vor allem eine Typ I IFN-Antwort aus. Für die Hepatitis C-Virusinfektion konnte im Schimpansen-Modell ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Typ I IFN-Antwort und der Induktion des Immunoproteasoms gezeigt werden [99]. Unabhängig davon wurde wiederholt im Mausmodell der CVB3-Myokarditis der Nachweis erbracht, dass Typ I IFN hier protektiv wirken [81,82]. Basierend auf diesen Vorarbeiten sollte der Effekt der Typ I IFN-Antwort auf die Immunoproteasom-Expression und die Epitopgenerierung durch das Proteasom in der CVB3-Myokarditis untersucht werden.

Die von der Virämie gekennzeichnete Frühphase der CVB3-Myokarditis (d4 p.i.) weist keine relevanten phänotypischen Unterschiede zwischen resistenten C57BL/6 und suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen auf [72]. Die akute Phase der Infektion (d8 p.i.) ist bei A.BY/SnJ Mäusen durch eine im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen hohe Viruslast, massive Invasion von Entzündungszellen und eine damit einhergehende Gewebeerstörung charakterisiert. Im Herz CVB3-infizierter Mäuse zeigte sich eine frühe myokardiale Induktion der IFN- α - und IFN- β -mRNA Expression in resistenten C57BL/6 Mäusen an d3 p.i. Die Typ I IFN-Antwort war dagegen im Herz von A.BY/SnJ Mäusen deutlich reduziert. Das frühe Expressionsmaximum der Typ I IFN korrelierte bei C57BL/6 Mäusen mit der Expression der Immununtereinheiten β 1i/LMP2, β 2i/MECL1 und β 5i/LMP7. Im Gegensatz dazu war der frühe Anstieg der myokardialen mRNA-Expression der Immununtereinheiten bei A.BY/SnJ Mäusen deutlich geringer ausgeprägt. Hier zeigte sich das Expressionsmaximum des Immunoproteasoms im Herz um Tag 8 p.i. zeitgleich mit der maximalen IFN- γ Antwort. Die Effekte der Immunoproteasom-Expression auf die Generierung der CVB3-Epitope VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎ und P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎, die beide Immunoproteasom-abhängig generiert werden [98,100], wurden mit Herz-20S Proteasom zu verschiedenen Zeitpunkten der Myokarditis geprüft. Unsere Experimente zeigten, dass die vermehrte Immunoproteasom-Expression in der Frühphase der Myokarditis in C57BL/6 Mäusen mit einer effizienten Epitopgenerierung durch das myokardiale Proteasom verbunden war. Im Gegensatz dazu waren Effekte auf die Antigenprozessierung durch das Proteasom im Herz infizierter A.BY/SnJ Mäuse erst zu einem späteren Zeitpunkt (hier Tag 8 p.i.) nachweisbar [101].

Jäkel S, Kuckelkorn U, Szalay G, Plötz M, Textoris-Taube K, Opitz E, Klingel K, Stevanovic S, Kandolf R, Kotsch K, Stangl K, Kloetzel PM, Voigt A. *Differential interferon responses enhance viral epitope generation by myocardial immunoproteasomes in murine enterovirus myocarditis*. American Journal of Pathology, 2009; 175:510-518.

Seite 45-53

2.4 Eine eingeschränkte Antigenpräsentationskapazität von dendritischen Zellen geht mit einer schweren Coxsackievirus B3-Myokarditis einher

Im Mausmodell der CVB3-Myokarditis haben wir verschiedene Aspekte der Antigenpräsentations-Maschinerie analysiert. Die myokardiale mRNA-Expression von MHC Klasse I-Molekülen und TAP-Peptidtransportern folgte dem Expressionsmuster von Typ I IFN [101]. Die naive Phase der Immunantwort scheint für den weiteren Verlauf der Erkrankung mit der Frage einer Chronifizierung eine wichtige Rolle zu spielen [81,102]. Dendritischen Zellen (DC) kommt als professionellen APZ eine grundlegende Funktion bei der Initiierung einer Immunantwort zu. Untersuchungen zur Aktivierung von DC in der CVB3-Infektion zeigten, dass die Chemokin-Antwort bei DC aus A.BY/SnJ Mäusen deutlich eingeschränkt ist [103]. Ziel unserer weiterführenden Arbeiten war es, den Phänotyp sowie die Funktionalität der DC in der CVB3-Myokarditis detailliert zu charakterisieren.

Im Gegensatz zu DC aus C57BL/6 Mäusen zeigten DC aus A.BY/SnJ Mäusen deutliche Defizite in der Maturierung und Aktivierung während der Frühphase der CVB3-Infektion. So konnten wir in der CVB3-Infektion in dem suszeptiblen A.BY/SnJ Stamm keine relevante Induktion der für die Antigenpräsentations-Funktion der DC entscheidenden ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD40 und CD86 auf der Zelloberfläche der DC nachweisen. Während die DC-Maturierung/Aktivierung in C57BL/6 Mäusen mit der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und Typ I IFN einherging, wiesen DC aus A.BY/SnJ Mäusen hier ebenfalls einen Defekt auf. Diese Defizite in der DC-Maturierung/Aktivierung bei DC aus A.BY/SnJ Mäusen waren mit einer verminderten Fähigkeit zur Kreuzpräsentation exogener MHC Klasse I-Moleküle in diesem Mausstamm vergesellschaftet. Während der DC-Maturierung kommt es zur passageren Akkumulation von poly-ubiquitylierten Proteinen, sog. DALIS (dendritic cell aggresome-like structures) [104,105]. In DALIS werden poly-ubiquitylierte DRiP, die eine Quelle für MHC Klasse I-restringierte Peptide darstellen, bis zur vollständigen Maturierung der DC gespeichert und dann dem Abbau durch das Proteasom zugeführt [106,107]. Wir konnten in DC aus A.BY/SnJ Mäusen zeigen, dass die CVB3-Antigen-enthaltenden DALIS auch in reifen DC persistieren und dadurch möglicherweise die Quelle antigener CVB3-Peptide limitiert ist. DALIS wurden hingegen in DC aus C57BL/6 Mäusen während der Maturierung effizient abgebaut. Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass die eingeschränkte Funktionalität von DC zumindest teilweise ursächlich für die Unfähigkeit zur Viruselimination in A.BY/SnJ Mäusen ist [108].

Rahnefeld A, Ebstein F, Albrecht N, Opitz E, Kuckelkorn U, Stangl K, Rehm A, Kloetzel PM, Voigt A. *Antigen Presentation Capacity of Dendritic Cells is Impaired in Ongoing Enterovirus-Myocarditis*. European Journal of Immunology, 2011; Eur J Immunol. 2011 Sep; 41:2774-2781.

Seite 55-62

2.5 Das Immunoproteasom reguliert die zelluläre Proteinhomöostase bei Zytokin-induziertem oxidativen Stress

Das Immunoproteasom weist im Vergleich zum Standardproteasom eine veränderte proteolytische Kapazität auf [31], die in einigen Fällen mit einer gesteigerten Generierung von MHC Klasse I-Epitopen assoziiert ist [32,43,45,98]. Auch in der Frühphase der CVB3-Myokarditis zeigte sich infolge der vermehrten Immunoproteasom-Expression im infizierten Herz eine effiziente Generierung von CVB3-Epitopen **[101]**. Die *in vivo* Bedeutung dieser *in vitro* nachweisbaren erhöhten Antigenprozessierungsrate wird kontrovers diskutiert. Unsere weiterführenden Untersuchungen zur *in vivo* Rolle des Immunoproteasoms zeigten, dass die wesentliche Funktion der durch IFN und Zytokine induzierten Immununtereinheiten im Schutz der Zelle vor IFN-induziertem oxidativen Stress besteht. Die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species (ROS)*) bei systemischer IFN-Ausschüttung führt zur oxidativen Modifizierung von neu synthetisierten Proteinen, die als geschädigte Proteine dem DRiP-Pool zuzuordnen sind. Das UPS adaptiert unter anderem seine Prozessierungskapazität in diesen Situationen und schützt die Zelle durch die Induktion des Immunoproteasoms mit der damit einhergehenden erhöhten Prozessierungsrate vor der Schädigung durch oxidativ-modifizierte, toxische Proteine. Diese Funktion spiegelte sich in einer verminderten Zellvitalität in Immunoproteasom-defizienten Zellen nach IFN-Exposition wider. Eine Störung der Proteinhomöostase bei Immunoproteasom-Defizienz ging mit einer Akkumulation von Proteinen des DRiP Pools in *aggresome-like structures (ALIS)* einher. Diese Effekte konnten wir auch im Mausmodell der Lipopolysaccharid-induzierten Leberzellschädigung und in der experimentellen akuten Enzephalomyelitis (EAE) beobachten. Immunoproteasom-defiziente Mäuse wiesen in der EAE einen schweren Krankheitsverlauf auf. Unsere Daten zeigen, dass die Hauptfunktion des Immunoproteasoms in der Protektion der Zelle vor IFN-induziertem oxidativen Stress liegt **[109]**. Der durch das Immunoproteasom gesteigerte Substratumsatz führt zudem zu einer vermehrten Generierung von MHC Klasse I-Liganden und stellt damit eine Form der Anpassung der Zelle an eine Infektion dar.

Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange L, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Krüger E. *Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress*. Cell, 2010; 142:613-624.

Seite 64-75

2.6 Die Funktionseinschränkung des Immunproteasoms durch β 5i/LMP7-Gendeletion führt zu einer schweren Coxsackievirus B3-Myokarditis

Das Immunproteasom wird im Herz von C57BL/6 Mäusen, die nach einer milden akuten Virusmyokarditis eine *restitutio ad integrum* aufweisen, bereits in der Frühphase der Kardiomyozytenschädigung induziert. Die dadurch erhöhte Generierungsrate antigener CVB3-Epitope [101] hatte keinen Einfluss auf die CD8⁺ T Zell-Antwort: die Anzahl VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎-spezifischer CD8⁺ T Zellen war in Immunproteasom-kompetenten und Immunproteasom-defizienten Mäusen gleich. Adoptive Transferexperimente mit CD8⁺ Gedächtnis-T Zellen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf einen Effekt des Immunproteasoms auf die CD8⁺-spezifische T Zell-Antwort im CVB3-Myokarditis-Modell. Demgegenüber stand in der Akutphase der CVB3-Myokarditis die Beobachtung, dass Immunproteasom-defiziente Mäuse eine deutlich vermehrte myokardiale Inflammation und Kardiomyozytennekrose aufweisen. Die Viruslast war im Herz von Immunproteasom-kompetenten und Immunproteasom-defizienten Mäusen identisch. Somit stellte sich in Anbetracht der neu identifizierten Hauptfunktion des Immunproteasoms im Schutz der Zelle vor IFN-induziertem oxidativen Stress [109] die Frage, ob auch im viralen Infektionsmodell dem Immunproteasom diese Funktion zugeschrieben werden kann. In der Tat zeigten unsere Daten, dass das Immunproteasom in der Virusinfektion in den mit pro-inflammatorischen Zytokinen und IFN-exponierten Kardiomyozyten und Entzündungszellen zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase beiträgt. Im Immunproteasom-defizienten Herz konnten wir in der akuten Myokarditis vermehrt Aggregate poly-ubiquitinylierter Proteine und eine Anhäufung oxidativ-modifizierter Proteine nachweisen. Diese in ALIS akkumulierenden Proteine wurden in Kardiomyozyten, aber auch in einwandernden Entzündungszellen nachgewiesen. Zusammen mit der Beobachtung einer verminderten Aktivierung des anti-apoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors NF- κ B führte die gestörte Proteinhomöostase im Herz von Immunproteasom-defizienten Mäusen zur Apoptose und damit zur Exazerbation der akuten Virus-vermittelten Myokardschädigung. Unsere Daten zeigen, dass das Herz-Immunproteasom das Zielorgan der CVB3-Infektion vor exzessiver Entzündungsreaktion in einem Virus-induzierten Zytokinmilieu schützen kann [110].

Opitz E, Koch A, Klingel K, Schmidt F, Prokop S, Rahnefeld A, Sauter M, Heppner F, Völker U, Kandolf R, Kuckelkorn U, Stangl K, Krüger E, Kloetzel PM, Voigt A. *Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis*. PLoS Pathogens, 2011 Sep;7(9):e1002233.

Seite 77-89

3. Übergreifende Diskussion und Ausblick

Coxsackieviren sind häufige Auslöser einer Myokarditis im Mensch. Sie kann Ursache einer DCM und damit einer chronischen Herzinsuffizienz sein. Das Mausmodell der CVB3-Myokarditis eignet sich für die Untersuchung von Suszeptibilitätsfaktoren, die einen chronischen Verlauf begünstigen. Die aktive Bekämpfung von intrazellulär vorkommenden Coxsackieviren durch das Immunsystem erfordert eine wirksame CD8⁺ T Zell-vermittelte Erkennung und Zerstörung von infizierten Kardiomyozyten, die wiederum ein optimales *Priming* von CVB3-Epitop-spezifischen T Zellen voraussetzt. Dafür werden professionelle APZ benötigt. Die Typ I IFN-Antwort in der Frühphase der Myokarditis in DC und Kardiomyozyten spielt in diesem Prozess eine entscheidende Rolle. Dadurch wird das Immunoproteasom im Herz CVB3-infizierter Mäuse, dem Zielorgan der zellulären Immunantwort, induziert. Das Immunoproteasom verhindert infolge einer gesteigerten Proteolyse die Akkumulation von toxischen, durch oxidativen Stress geschädigten Proteinkonglomeraten und führt zur effizienten Generierung von CVB3-Epitopen in Kardiomyozyten. Das im Rahmen der Virusinfektion einem oxidativen Stress exponierte Herz wird durch das Immunoproteasom vor apoptotischem Zelluntergang geschützt.

Die Analyse der myokardialen MHC Klasse I-Antigenpräsentations-Maschinerie im Mausmodell der CVB3-Myokarditis in resistenten und suszeptiblen Mausstämmen war Grundlage unserer Arbeiten. Dabei konnten wir wie bereits in C3H/He Mäusen gezeigt [83] eine Induktion der Expression von MHC Klasse I-Molekülen und TAP-Peptidtransportern im Herz nachweisen [92]. Dies ist für eine effiziente Antigenpräsentation entscheidend [111]. Die vermehrte Inkorporation der durch IFN-induzierbaren Immununtereinheiten des Proteasoms in der Akutphase der CVB3-Myokarditis bedingte eine Steigerung der katalytischen Aktivität des Herz-20S Proteasoms [101]. Dieser erste *in vivo* Nachweis der Induktion des Immunoproteasoms im Herz deckt sich mit Befunden aus anderen Infektionsmodellen. In der LCMV- und *L. monocytogenes* Infektion in der Leber wurde ein nahezu vollständiger IFN- γ -abhängiger Austausch der katalytisch aktiven Untereinheiten p.i. nachgewiesen [32,33]. Dagegen war im Herz infizierter Mäuse die Menge des Standardproteasoms nicht signifikant reduziert, so dass hier Standard- und Immunoproteasom parallel existierten. Die Expression des Immunoproteasoms war in C57BL/6 Mäusen bereits während einer Phase der CVB3-Myokarditis zu beobachten, in der kaum Entzündungszellen vorhanden waren [101]. Diese Beobachtung passt zum direkten Nachweis einer erhöhten $\beta 5i$ /LMP7 mRNA-Expression in

Kardiomyozyten aus dem infizierten Mausherz [92]. Der basal nur geringen Expressionsrate der drei Immununtereinheiten des Proteasoms im Herz [92,101,112] steht eine hohe Immunoproteasom-Expression in Zellen des lymphatischen Systems gegenüber. Wir konnten in unreifen dendritischen Zellen überwiegend Immununtereinheiten nachweisen. Nach einer CVB3-Infektion oder IFN-Stimulation war wie von Macagno *et al.* gezeigt [24] keine relevante Expressionssteigerung der Immununtereinheiten in DC zu verzeichnen [113].

Die Inkorporation aller drei Immununtereinheiten in den 20S Kern-Komplex setzt während der Maturierung des 20S Proteasoms die Anwesenheit der $\beta 5i/LMP7$ -Untereinheit voraus. Liegt eine Gendelektion von $\beta 5i/LMP7$ vor, können $\beta 2i/MECL-1$ und $\beta 1i/LMP2$ sowohl im Infektionsmodell *in vivo* als auch nach IFN-Stimulation *in vitro* nicht suffizient in den 20S Kern-Komplex von Kardiomyozyten eingebaut werden [110]. Die detaillierte Untersuchung der Zusammensetzung des Proteasoms ist notwendig, da neben dem Standard- und Immunoproteasom auch Proteasom-Mischformen existieren können. In $\beta 1i/LMP2$ -defizienten Mäusen wurde eine effiziente Inkorporation von $\beta 2i/MECL-1$ und $\beta 5i/LMP7$ in das 20S Proteasom aus B-Zellen beschrieben; dieses Proteasom wurde als Mischproteasom bezeichnet [48]. Im Gegensatz dazu konnten Griffin *et al.* *in vitro* nachweisen, dass der Einbau von $\beta 2i/MECL-1$ in den 20S Kern-Komplex die Anwesenheit von $\beta 1i/LMP2$ voraussetzt [114]. Unsere Daten aus dem CVB3-Myokarditismodell zeigen hingegen eine effiziente Inkorporation von $\beta 1i/MECL-1$ und $\beta 5i/LMP7$ in das 20S Proteasom aus $\beta 1i/LMP2$ -defizienten Mausherzen (nicht-publizierte Daten) und stützen die Beobachtungen aus naiven B Zellen dieser Mäuse [48]. Diese teilweise diskrepanten Aussagen unterstreichen die Notwendigkeit der sorgfältigen Dateninterpretation bei der Analyse der funktionellen Relevanz des Immunoproteasoms in diesen Modellen.

Der Funktionsanalyse des Immunoproteasoms im Herz von CVB3-infizierten Mäusen lagen folgende Befunde zugrunde: das Immunoproteasom steigert die Substratumsatzrate [98,100,115]; es weist veränderte Schnittstellen-Präferenzen auf [116,117]; die katalytische Aktivität des Immunoproteasoms kann zur Effizienzsteigerung der Prozessierung von MHC Klasse I-restringierten Epitopen führen [32,39,40]. Grundlegende Voraussetzung für die Untersuchung der *in vivo* Rolle der Immunoproteasom-Induktion für die Antigenprozessierung in der CVB3-Myokarditis ist die Tatsache, dass eine $CD8^+$ T Zell-Antwort für die CVB3-Eliminierung notwendig ist. Untersuchungen in Perforin-defizienten Mäusen ergaben zunächst keine

Auswirkung einer Perforin-abhängigen CD8⁺ T Zell-Antwort auf die Viruslast in der CVB3-Infektion [94]. Demgegenüber konnte in β_2 -Mikroglobulin-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, dass der MHC Klasse I-Weg der Antigenpräsentation und damit mutmaßlich auch die CD8⁺ T Zell-Antwort für den Verlauf der CVB3-Myokarditis entscheidend sind [93,94]. Die verminderte Typ II IFN-Antwort in β_2 -Mikroglobulin-defizienten Mäusen wurde mit einer fulminanten akuten Myokarditis, hoher Viruslast und chronischer Viruspersistenz in diesem Mausstamm in Zusammenhang gebracht [94]. Andere Untersuchungen zeigten allerdings eine durch CD8⁺ T Zellen verursachte Exazerbation der Entzündung im infizierten Mausherz, die auch für eine Myokardfibrose verantwortlich gemacht wurde [93]. Abgesehen von diesen allgemeinen Aussagen zur CD8⁺ T Zell-Antwort in der CVB3-Infektion existierten bislang keine Daten zu spezifischen MHC Klasse I-restringierten CD8⁺ T Zell-Epitopen des CVB3. Die Gruppe um J.L. Whitton *et al.* argumentierte, dass eine akute CVB3-Infektion keine spezifische CD8⁺ und CD4⁺ T Zell-Antwort auslösen kann. Grundlage dieser Aussage sind Untersuchungen von LCMV-MHC Klasse I-Epitopen im Kontext einer CVB3-Plasmid-cDNA [118]. In HeLa-Zellen wurde nach CVB3-Infektion die Expression der MHC Klasse I-Moleküle herunter reguliert [119]. Dies wurde als *immune escape* Mechanismus des Virus interpretiert.

Aus unserer Sicht war mit diesen Experimenten keine definitive Aussage über *in vivo* vorkommende CVB3-MHC Klasse I-Epitope möglich. Wie in 2.2 beschrieben, haben wir mit verschiedenen *in silico* Peptidvorhersage-Datenbanken 13 vorwiegend N-terminal im Virusprotein lokalisierte, H-2^b restringierte CVB3-MHC Klasse I-Liganden ausgewählt und diese auf ihre Generierung durch das Proteasom geprüft. Für die Epitope VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎ und P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎ konnten wir spezifische CD8⁺ T Zellen *ex vivo* in relativ geringer Anzahl nachweisen [98,101,110]. Die IFN- γ Sekretion durch P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎-spezifische CD8⁺ T Zellen lag dabei in ähnlicher Dimension wie für Hepatitis C Virus- und Reovirus-Epitope gezeigt [99,120]. Im Vergleich mit LCMV- oder Influenzavirus-Modellen scheinen die hier identifizierten CVB3-Epitope jedoch nur eine gering ausgeprägte CD8⁺ T Zell-Antwort auszulösen. Sie spiegeln am ehesten immuno-subdominante Epitope wider. Unser experimenteller Ansatz bei der Epitopidentifizierung beinhaltete nicht das komplette CVB3-Polyprotein, so dass noch andere, hier nicht untersuchte CVB3-spezifische Epitope existieren können. Die Analyse der Effekte des Immunoproteasoms auf die Generierung der von uns identifizierten, mutmaßlich immuno-subdominanten Epitope ist vor allem vor dem Hintergrund wichtig, dass das Immunoproteasom die Quantität einzelner Epitope steigern [32] und die verfügbare Menge präsentierter Antigene in dafür prädestinierten Zellen regulieren kann [102].

Unsere Prozessierungsanalysen zeigten, dass sowohl das Standard- als auch das Immunoproteasom in der Lage ist, die CVB3-Peptide VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎, P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎, VP4₍₃₈₋₄₆₎, VP3₍₃₇₀₋₃₇₈₎, P2C₍₁₁₇₅₋₁₁₈₃₎ bzw. die CVB3-Peptid-*Precursor* VP2₍₂₈₄₋₂₉₂₎, VP3₍₃₇₀₋₃₇₈₎, P2C₍₁₁₇₅₋₁₁₈₃₎, P3C₍₁₅₆₁₋₁₅₆₈₎ und P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎ zu generieren **[98,100,101]**. Das Immunoproteasom zeigte in diesen Beispielen wie erwartet [115] eine gesteigerte Substratumsatzrate; wir konnten quantitativ mehr Epitopfragmente nachweisen **[98,100]**. Dies war auch darauf zurückzuführen, dass das Immunoproteasom die Schnitte am N- oder C-Terminus der Epitope VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎ und P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎ bzw. des *Precursor*-Peptids von P2C₍₁₁₇₅₋₁₁₈₃₎ vorzugsweise generierte **[98,100]**. Qualitative Unterschiede waren in den Prozessierungsanalysen mit dem Standard- und Immunoproteasom nicht vorhanden **[98]**, d.h., es wurden die gleichen Peptidfragmente detektiert. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten auch mit anderen Modellpeptiden keine gravierenden qualitativen Unterschiede im Muster der durch das Standard- und Immunoproteasom generierten Peptide beobachtet werden [117].

Die Tatsache, dass sowohl das H-2D^b-restringierte VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎ und das H-2K^b-restringierte P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎ Epitop Immunoproteasom-abhängig generiert wurden **[98]**, und für beide Peptide eine Epitop-spezifische CD8⁺ T Zell-Antwort nachweisbar war **[101]**, qualifizierte diese Liganden für die Analyse der Effekte einer Immunoproteasom-Expression im Herz von CVB3-infizierten Mäusen. In Prozessierungsanalysen mit dem Herz-20S Proteasom konnten wir zeitgleich zur vermehrten myokardialen Expression des Immunoproteasoms eine vermehrte Epitopgenerierung zeigen. Eine effiziente Epitop-Generierung wurde zum Zeitpunkt Tag 4 p.i. in C57BL/6 Mäusen und Tag 8 p.i. in A.BY/SnJ Mäusen jeweils zeitgleich mit dem Stamm-spezifischen Expressionsmaximum der Immununtereinheiten beobachtet **[101]**. Zur Klärung der Frage, ob das Immunoproteasom im infizierten Mausherz für die Epitopgenerierung wichtig ist, müsste die CVB3-Myokarditis in Herz-spezifischen, konditionellen Immunoproteasom-defizienten Mäusen untersucht werden. Momentan sind diese Modelle nicht verfügbar. Eine mögliche Interpretation unserer Daten stellt einen Zusammenhang der verspäteten Induktion des Immunoproteasoms im Herz CVB3-infizierter A.BY/SnJ Mäuse mit dem chronischen Phänotyp in diesem Mausstamm her. Dies wird durch folgende Beobachtungen gestützt. A.BY/SnJ Mäuse weisen einen Defekt in der Viruselimination, also damit mutmaßlich in der CD8⁺ T Zell-Antwort auf [72]. Die frühe Immunoproteasom-abhängige Antigenprozessierung ist für die Immunogenität von Epitopen wichtig [102]. Das naive Herz weist eine geringe basale Immunoproteasom-Expression auf [121]. Auch dieser Aspekt unterstreicht, dass in infizierten Kardiomyozyten eine zeitgerechte Anpassung an die Antigenprozessierung erfolgen muss. In

diesem Kontext sind auch die positiven Effekte der Immunoproteasom-Expression auf die Pathogenlast bzw. die Überlebensraten in Infektionsmodellen mit *Toxoplasma gondii* [122], *Trypanozoma cruzi* [123] und *Listeria monocytogenes* [32] erwähnenswert. Diese Ergebnisse aus Experimenten mit Immunoproteasom-defizienten Mäusen spiegeln jedoch anders als im Mausmodell der CVB3-Myokarditis Befunde einer Deletion der $\beta 5i$ /LMP7-Untereinheit auch in Immunzellen wider.

Die differierende Typ I IFN-Kinetik in C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen [101] passt zu der Beobachtung, dass DC aus A.BY/SnJ Mäusen aufgrund einer defekten Typ I IFN- und Chemokin-Antwort [103] deutliche Maturierungs- und Aktivierungsdefekte aufwiesen [108]. Die Relevanz dieser Daten wird durch Befunde aus dem HIV- und HCV-Infektionsmodell gestützt. Hier wurde der chronische Krankheitsverlauf mit Maturierungsdefekten der DC in Zusammenhang gebracht [124,125]. In den DC der A.BY/SnJ Mäuse kann die relativ erhöhte Viruslast mit zu den Gen-regulatorischen Defiziten beitragen, da CVB3-Virusproteine einen Transkriptions-/Translationsabbruch von Wirtsproteinen in infizierten Zellen auslösen können [126,127]. Die effiziente Typ I IFN-Antwort in C57BL/6 Mäusen hingegen hatte eine erhöhte IRF-1 Expression zur Folge. IRF-1 kann wiederum Zytokine/IFN, ko-stimulatorische Moleküle sowie die RNA-Helikasen Mda-5 und RIG-1 in DC induzieren [128]. Mda-5 und RIG-1 binden virale RNA und können so möglicherweise Einfluss auf die Viruslast und Maturierung in den DC nehmen [108].

Die durch Typ I IFN-induzierten Prozesse wie Expression von Immununtereinheiten, gesteigerte Antigenprozessierung im Herz infizierter Mäuse [101] sowie Maturierung dendritischer Zellen [108] unterstreichen die Bedeutung der angeborenen Immunität. Die Typ I IFN-vermittelte Signaltransduktion induziert auch die Expression von ISG15 und ISGylierenden Enzymen im Herz (nicht-publizierte Daten) und in DC CVB3-infizierter Mäuse [108]. Die ISGylierung wurde in anderen Infektionsmodellen mit antiviralen Effekten in Zusammenhang gebracht [129,130]. Wir haben bereits in ersten Experimenten die Rolle dieses Ubiquitin-ähnlichen Moleküls in der CVB3-Myokarditis untersucht. ISG15-defiziente Mäuse zeigten einen fulminanten Phänotyp in der Akutphase der Infektion. In diesen Mäusen kam es zur Entwicklung einer chronischen Myokarditis mit einer Viruspersistenz und einer massiven Myokardfibrose (nicht-publizierte Daten). Während wir hier durch Typ I IFN-induzierte Effekte hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Pathogenese der CVB3-Myokarditis näher charakterisiert haben, zielten Experimente mit Typ I IFN-Rezeptor- [81] und IFN- β -defizienten [82] Mäusen auf die generelle

Rolle der naiven Immunantwort hin und zeigten protektive Effekte derselben. In Einklang mit diesen Untersuchungen haben verschiedene Gruppen die der Typ I IFN-Antwort übergeordnete TLR-vermittelte Signaltransduktion in der CVB3-Myokarditis untersucht. Die Expression von TRIF [131] und TLR3 [103] schützte vor einer Exazerbation der CVB3-Infektion, die z.T. direkt mit der Typ I IFN-Expression in Verbindung gebracht werden konnte [131]. Im Gegensatz dazu war eine Deletion von TLR4, IL-12-Rezeptor $\beta 1$ [132] und MyD88 [80] mit protektiven Effekten auf die Ausprägung der CVB3-Myokarditis verbunden, die in MyD88-defizienten Mäusen mit einer erhöhten IRF3-abhängigen IFN- β Expression korrelierte [80]. Die Bedeutung der Typ I IFN-Antwort für die Viruselimination hat sich in allen Analysen bestätigt. Ein erster erfolgreicher translationaler Ansatz ist in diesem Zusammenhang hervorzuheben. In einer Pilotstudie wurde bei Patienten mit einem Enterovirus- oder Adenovirus-Nachweis im Herz nach IFN- β Therapie eine Viruselimination beobachtet, die mit einer systolischen Funktionsverbesserung assoziiert war [133].

Unsere weiteren Untersuchungen zielten auf die Frage ab, warum es in einer Infektion und der damit verbundenen Sekretion von IFN zur Reifung eines Proteasoms mit einer erhöhten Substratumsatzrate kommt. Die Beobachtung, dass das Immunoproteasom im Vergleich zum Standardproteasom einzelne MHC Klasse I-Liganden effizienter generieren kann, war Grundlage für die inhaltliche Assoziation zwischen Immunoproteasom-Funktion und adaptiver CD8⁺ T Zell-Antwort. Die teilweise marginalen Effekte der Immunoproteasom-Expression auf die CD8⁺ T Zell-Antwort sprechen jedoch gegen das Alleinstellungsmerkmal der Immunoproteasom-Funktion in der Antigenprozessierung [32,42,46]. Betrachtet man die Effekte einer IFN-Antwort in einer systemischen Infektion genauer, so betreffen diese Pathogen-exponierte, aber auch nicht-Pathogen-exponierte Zellen. Das Immunoproteasom wird auch in nicht-Pathogen-exponierten Zellen induziert. Diese Beobachtung suggeriert eine über die Antigenprozessierung hinausreichende Funktion des Immunoproteasoms. Bei einer IFN-Stimulation kommt es zu einer generellen Induktion der zellulären Proteintranslation **[109]**. Die Mehrzahl der sich neu bildenden Proteine ist durch Translationsfehler, Faltungsdefekte oder oxidative Schädigung bedingt dem DRiP-Pool zugehörig und muss somit vom Proteasom abgebaut werden [1,36]. Infolge einer IFN-Exposition [134] und auch in der CVB3-Infektion [135] werden ROS gebildet, die eine oxidative Schädigung der sich neu bildenden Proteine bedingen [136]. Wir konnten in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen zeigen, dass die durch Immununtereinheiten-Einbau gesteigerte katalytische Aktivität des Proteasoms entscheidend am suffizienten Abbau des DRiP-Pools beteiligt ist. Das 26S Immunoproteasom reguliert die zelluläre

Proteinhomöostase und wirkt damit der Akkumulation oxidativ-geschädigter, poly-ubiquitinylierter Proteine entgegen [109]. Dementsprechend konnten wir in Immunoproteasom-defizienten Zellen *in vivo* und *in vitro* nach IFN-Exposition vermehrt ALIS nachweisen [109]. In diesen ALIS akkumulieren poly-ubiquitinylierte DRiP [137]. Die Induktion des Immunoproteasoms spiegelt die durch verschiedene Stressfaktoren ausgelöste Anpassung des UPS an den gesteigerten Proteinumsatz wider.

Die Mehrzahl der viralen MHC Klasse I-Liganden entstammen dem DRiP Pool, der durch das 26S Proteasom abgebaut wird [35,36]. Durch die gesteigerte Substratumsatzrate des Immunoproteasoms lässt sich so die Effizienzsteigerung in der Prozessierung viraler Epitope erklären. Für die CVB3-Infektion konnten wir in DC während der Maturierung den Nachweis erbringen, dass auch Virusproteine des CVB3 in ALIS akkumulieren [108] und wahrscheinlich dem DRiP-Pool zugehörig sind [36]. Adoptive Transferexperimente mit CVB3-Gedächtnis-CD8⁺ T Zellen in β 5i/LMP7-defizienten Mäusen sprachen gegen einen relevanten Effekt des Immunoproteasoms auf die CD8⁺ T Zell-Antwort in der CVB3-Infektion [110]. Die effektive Viruselimination in CVB3-infizierten β 5i/LMP7-defizienten Mäusen unterstützt diese Aussage. Andererseits muss hier berücksichtigt werden, dass die Rolle der CD8⁺ T Zell-Antwort in diesem Modell wie beschrieben kontrovers diskutiert wird. Trotz der identischen Viruslast konnten wir jedoch in Immunoproteasom-defizienten Mäusen eine Exazerbation der akuten Myokarditis nachweisen [110]. Aus unserer Sicht beruhte dieser Myokardschaden auf folgenden Tatsachen. Die systemische und lokale IFN/Zytokin-Antwort führte zum Anwachsen des durch oxidative Schädigung charakterisierten DRiP-Pools im Herz infizierter Mäuse. Die Immunoproteasom-Defizienz hatte auch in der CVB3-Infektion eine Akkumulation von ALIS in Kardiomyozyten und einwandernden Immunzellen zur Folge. Auf die Zell-schädigenden Konsequenzen einer ALIS-Akkumulation wurde bereits eingegangen [1]. Zudem konnten wir in Übereinstimmung mit publizierten Daten [48,53,109,138,139] in Kardiomyozyten und Entzündungszellen aus Immunoproteasom-defizienten Mäusen eine verminderte Aktivierung des anti-apoptischen [140] Transkriptionsfaktors NF- κ B nachweisen [110]. NF- κ B ist an der Regulierung der Immunhomöostase auch in Entzündungskrankheiten beteiligt [141]. Diese Faktoren scheinen für den massiven Zellschaden im Herz infizierter Immunoproteasom-defizienter Mäuse ursächlich zu sein. Unsere Daten zeigen erstmals *in vivo*, dass das Immunoproteasom im Kontext einer Virusinfektion vor Apoptose schützen kann [110]. Der vermehrte Zelluntergang bei Immunoproteasom-Defizienz kann zur Freisetzung von *damage-associated molecular patterns* (DAMP) und damit zur Aktivierung der TLR-abhängigen Expression pro-inflammatorischer

Gene führen, die die Entzündung in Immunoproteasom-defizienten Mäusen weiter verstärken können [142].

Die hier auch im Virusmodell beschriebene Rolle des Immunoproteasoms in der Regulation der Proteinhomeostase stellt die bisherige Funktion desselben in einen über die Antigenprozessierung hinaus reichenden Kontext. Vor diesem Hintergrund erscheint auch eine kritische Betrachtung möglicher Interventionsansätze mit Immunoproteasom-spezifischen Inhibitoren notwendig. Zunächst sei die Bedeutung der genauen Charakterisierung der Komposition des Proteasoms im zu untersuchenden Modell hervorgehoben. Die hier dem Immunoproteasom zugeschriebene Funktion beruht auf Untersuchungen in $\beta 5i/LMP7$ -defizienten Mäusen, die im Herz in der Frühphase der Myokarditis eine fehlende Inkorporation aller drei induzierbaren Untereinheiten aufweisen [110]. Analysen der CVB3-Myokarditis in $\beta 1i/LMP2$ -defizienten Mäusen zeigen bei effektivem Einbau von $\beta 5i/LMP7$ und $\beta 2i/MECL-1$ in den 20S Kern-Komplex einen vollkommen differierenden Phänotyp. Die Deletion von $\beta 1i/LMP2$ war mit einer deutlich abgeschwächten Myokarditis und gleichzeitigem Erhalt der myokardialen Funktion in der CVB3-Infektion vergesellschaftet (nicht-publizierte Daten). Unsere Daten zur Immunoproteasom-Funktion im Herz rücken die Möglichkeit einer therapeutischen Interferenz mit einzelnen Proteasom-Untereinheiten in ein neues Licht. Der in der Behandlung des multiplen Myeloms etablierte Inhibitor Bortezomib [143] weist keine relevante Spezifität für das Standard- oder Immunoproteasom auf und ist wegen seiner Nebenwirkungen nur begrenzt einsetzbar. Kürzlich wurde der Immunoproteasom-spezifische Inhibitor PR-957 vorgestellt. Der protektive Einsatz dieses $\beta 5i/LMP7$ -spezifischen Inhibitors im Modell der experimentellen Arthritis [52] und Colitis [144] legt eine klinische Testung desselben nahe. Andererseits muss hier kritisch angemerkt werden, dass die PR-957-Effekte in der experimentellen Colitis [144] den klinischen Befunden in den drei Immununtereinheiten-defizienten Mausstämmen $\beta 5i/LMP7^{-/-}$, $\beta 2i/MECL-1^{-/-}$ und $\beta 1i/LMP2^{-/-}$, die jeweils verschiedene Proteasom-Mischformen aufweisen, gleichen [144]. Darüber hinaus haben Schmidt *et al.* die protektiven Effekte der Proteasom-Inhibition im Colitis-Modell auch mit Bortezomib nachweisen können [53]. So bleibt in diesem Modell letztlich unklar, wie und ob die beobachteten Effekte einer spezifischen Untereinheit zuzuschreiben sind. Unabhängig von diesen Betrachtungen erscheint aufgrund unserer Daten [110] eine $\beta 5i/LMP7$ -spezifische Hemmung in der viralen Myokarditis nicht sinnvoll. Hier streben wir aufgrund der Befunde in $\beta 1i/LMP2$ -defizienten Mäusen die Testung eines $\beta 1i/LMP2$ -spezifischen Inhibitors *in vivo* an.

An dieser Stelle sei auf eine weitere Beobachtung eingegangen, die sich in allen Untersuchungen zur Rolle des Immunproteasoms in der experimentellen Arthritis und Colitis aufzeigte. Die verminderte Entzündung infolge der Interferenz mit der Immunproteasom-Funktion wurde einem veränderten Expressionsmuster pro-inflammatorischer Zytokine zugeschrieben [52,53,144]. Im Gegensatz dazu konnten wir im CVB3-infizierten Herz weder in $\beta 5i/LMP7$ - noch in $\beta 1i/LMP2$ -defizienten Mäusen Unterschiede in der Expression von IFN/Zytokinen im Vergleich zu Kontrollmäusen nachweisen **[110]** + (nicht-publizierte Daten). Daher scheint es sich bei der differierenden Zytokinexpression in Abhängigkeit der Immunproteasom-Funktion um Organ- und Krankheits-spezifische Effekte zu handeln.

Neben dem Einsatz spezifischer Inhibitoren legen die beschriebenen Phänotypen der CVB3-Myokarditis in Abhängigkeit der Expression von Immununtereinheiten des Proteasoms auch den translationalen Ansatz nahe, Patienten mit einer akuten Myokarditis bzw. einer DCM hinsichtlich bekannter Einzelnukleotid-Polymorphismen im *proteasome subunit beta 8 (PSMB8)* Gen ($\beta 5i/LMP7$) und *PSMB9* Gen ($\beta 1i/LMP2$) zu untersuchen. Grundlage dafür ist der Nachweis der protektiven Rolle des Immunproteasoms in der Myokarditis **[110]** und die Tatsache, dass Suszeptibilitätsfaktoren für die prognostische Einschätzung einer akuten Myokarditis beim Mensch fehlen. Die Thr75Met-Mutation im *PSMB8* Gen ist bei Patienten mit einer Pannikulitis-induzierten Lipodystrophie mit einer Reduktion der chymotryptischen Aktivität vergesellschaftet [145]. Bei Patienten, die am Nakajo-Nishimura-Syndrom leiden, wurde infolge einer Gly201Val-Mutation im *PSMB8* Gen eine Reduktion der Immunproteasom-Assemblierung und -Aktivität gezeigt. Diese ging mit einer Akkumulation von poly-ubiquitinylierten, oxidativ-modifizierten Proteinen einher [146]. In Anbetracht der hier diskutierten ALIS-Akkumulation im Herz CVB3-infizierter Immunproteasom-defizienter Mäuse [110] stellt die Gly201Val-Mutation in diesem Kontext einen sehr interessanten Polymorphismus dar. Darüber hinaus wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen im *PSMB9* Gen bei Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen [147,148]. Über die Analyse der Einzelnukleotid-Polymorphismen im Mensch hinaus werden wir daher auch die Effekte der Immununtereinheiten auf die Ausprägung der Troponin I-induzierten Autoimmun-Myokarditis [149] im Mausmodell untersuchen. Wir erhoffen uns, so weitere Informationen zur Rolle der induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der Pathogenese der Myokarditis und DCM zu erhalten.

4. Zusammenfassung

Coxsackieviren sind häufige Auslöser einer Myokarditis im Mensch, die zur dilatativen Kardiomyopathie führen kann. Das Mausmodell der Coxsackievirus B3 (CVB3)-Myokarditis eignet sich zur Untersuchung von Suszeptibilitätsfaktoren, die für eine chronische Erkrankung prädestinieren. Die aktive Bekämpfung der Coxsackieviren erfordert eine wirksame CD8⁺ T Zell-vermittelte Immunantwort. Die zeitgerechte Induktion der Typ I Interferone (IFN) führt in der Frühphase der CVB3-Myokarditis zur Maturierung/Aktivierung/Migration Antigen-präsentierender dendritischer Zellen und induziert in Kardiomyozyten als Zielzellen der Virusinfektion die Expression der MHC Klasse I-Antigenpräsentations-Maschinerie. Im Herz kommt es zur Assemblierung des Immunoproteasoms, das für eine beschleunigte Substratumsatzrate verantwortlich ist. Im Zuge dessen ist für die antigenen CVB3-Peptide VP2₍₂₈₅₋₂₉₃₎ und P3D₍₂₁₇₀₋₂₁₇₇₎ eine Effizienzsteigerung der Epitopprozessierung zu verzeichnen. Die Typ I IFN-Antwort in resistenten C57BL/6 Mäusen geht mit einer Viruselimination nach der akuten Erkrankungsphase einher. Im Gegensatz dazu zeigen Haplotyp-identische susceptible A.BY/SnJ Mäuse eine ausgeprägte akute Entzündung und sind durch einen chronischen Krankheitsverlauf mit Viruspersistenz charakterisiert. Die in diesen Mäusen nur rudimentär ausgeprägte Typ I IFN-Antwort scheint ursächlich für DC-Maturierungsdefekte und die verminderte myokardiale Immunoproteasom-Funktion in der Frühphase der Myokarditis in diesem Stamm zu sein. Die elementare Bedeutung der Immunoproteasom-Assemblierung und der dadurch bedingten Steigerung der katalytischen Aktivität der Protease in allen Zellen, die einer Zytokin/IFN-Antwort ausgesetzt sind, wird vor allem durch die in diesem Kontext ubiquitär gesteigerte Proteinsynthese deutlich. Die zusätzliche Bildung von ROS in der IFN-Antwort führt zur oxidativen Schädigung der sich neu bildenden Proteine im DRiP-Pool. Das 26S Immunoproteasom kann dem vermehrten Prozessierungsbedarf in der Zelle unter diesen Umständen gerecht werden; es reguliert die Proteinhomöostase in IFN-exponierten Zellen. Auch in der Virusmyokarditis schützt das Immunoproteasom das Herz vor dem toxischen Einfluss geschädigter Proteine und kann so die Zellvitalität in dieser kritischen Krankheitsphase stabilisieren. Für Patienten mit einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung sind diese wegweisenden Befunde zur Funktion des Immunoproteasoms im Entzündungsgeschehen Grundlage für die Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen der Immununtereinheiten des Proteasoms, für die funktionelle Defekte gezeigt wurden und die möglicherweise prognostische Relevanz haben.

5. Literaturangaben aus dem freien Text

1. Dantuma NP, Lindsten K (2010) Stressing the ubiquitin-proteasome system. *Cardiovascular Research* 85: 263-271.
2. Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 70: 503-533.
3. Herrmann J, Soares SM, Lerman LO, Lerman A (2008) Potential role of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 51: 2003-2010.
4. Patterson C, Ike C, Willis PW, Stouffer GA, Willis MS (2007) The bitter end: the ubiquitin-proteasome system and cardiac dysfunction. *Circulation* 115: 1456-1463.
5. Willis MS, Townley-Tilson WHD, Kang EY, Homeister JW, Patterson C (2010) Sent to Destroy The Ubiquitin Proteasome System Regulates Cell Signaling and Protein Quality Control in Cardiovascular Development and Disease. *Circulation Research* 106: 463-478.
6. Schwartz AL, Ciechanover A (1999) The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annual Review of Medicine* 50: 57-74.
7. Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94: 615-623.
8. Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W (1998) 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 121: 19-29.
9. Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB (1993) Evidence Indicating That the Human Proteasome Is A Complex Dimer. *Journal of Molecular Biology* 229: 14-19.
10. Kopp F, Hendil KB, Dahlmann B, Kristensen P, Sobek A, Uerkvitz W (1997) Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 2939-2944.
11. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology* 7: 1062-1067.
12. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 386: 463-471.
13. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural Biology* 7: 1062-1067.
14. Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baumeister W (1995) Proteasome from *Thermoplasma-Acidophilum* - A Threonine Protease. *Science* 268: 579-582.
15. Orłowski M, Wilk S (2000) Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383: 1-16.
16. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL (1999) The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes - Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *Journal of Biological Chemistry* 274: 3363-3371.
17. Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1994) Interferon-Gamma Stimulation Modulates the Proteolytic Activity and Cleavage Site Preference of 20S Mouse Proteasomes. *Journal of Experimental Medicine* 179: 901-909.
18. Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, Dietz K, Heinemeyer W, Groll M, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12504-12509.
19. Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 79-86.
20. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biology* 1: 221-226.
21. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416: 763-767.

22. Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 179-187.
23. Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K (2000) Hybrid proteasomes - Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 275: 14336-14345.
24. Macagno A, Kuehn L, de Giuli R, Groettrup M (2001) Pronounced up-regulation of the PA28 alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology* 31: 3271-3280.
25. Sijts A, Sun YC, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, Kloetzel PM (2002) The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Molecular Immunology* 39: 165-169.
26. Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, Hill CP (2000) Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408: 115-120.
27. Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1996) A role for the proteasome regulator PA28 alpha in antigen presentation. *Nature* 381: 166-168.
28. Sun Y, Sijts AJAM, Song MX, Janek K, Nussbaum AK, Kral S, Schirle M, Stevanovic S, Paschen A, Schild H, Kloetzel PM, Schadendorf D (2002) Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Research* 62: 2875-2882.
29. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A (1994) Interferon-Gamma Induces Different Subunit Organizations and Functional Diversity of Proteasomes. *Journal of Biochemistry* 115: 257-269.
30. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ (1993) Mhc-Linked Lmp Gene-Products Specifically Alter Peptidase Activities of the Proteasome. *Nature* 365: 262-264.
31. Kloetzel PM, Ossendorf F (2004) Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 16: 76-81.
32. Strehl B, Joeris T, Rieger M, Visekruna A, Textoris-Taube K, Kaufmann SHE, Kloetzel PM, Kuckelkorn U, Steinhoff U (2006) Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8(+) T cells. *Journal of Immunology* 177: 6238-6244.
33. Khan S, van den Broek M, Schwarz K, de Giuli R, Diener PA, Groettrup M (2001) Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *Journal of Immunology* 167: 6859-6868.
34. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the Proteasome Block the Degradation of Most Cell-Proteins and the Generation of Peptides Presented on Mhc Class-I Molecules. *Cell* 78: 761-771.
35. Reits EAJ, Vos JC, Gromme M, Neeffjes J (2000) The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404: 774-778.
36. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770-774.
37. Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, Janssen H, Calafat J, Drijfhout JW, Neeffjes J (2003) Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18: 97-108.
38. Saveanu L, Carroll O, Hassainya Y, van Endert P (2005) Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunological Reviews* 207: 42-59.
39. Sijts AJAM, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM (2000) Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *Journal of Experimental Medicine* 191: 503-513.
40. Schultz ES, Chapiro J, Lurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, Russo V, Morel S, Levy F, Boon T, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (2002) The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *Journal of Experimental Medicine* 195: 391-399.

41. Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, Van den Eynde BJ (2000) Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12: 107-117.
42. Sijts E, van der Meulen W, Kloetzel PM (2011) The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 1491-1502.
43. Sijts AJAM, Standera S, Toes REM, Ruppert T, Beekman NJCM, van Veelen PA, Ossendorp FA, Melief CJM, Kloetzel PM (2000) MHC class I antigen processing of an Adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *Journal of Immunology* 164: 4500-4506.
44. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM (2005) Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunological Reviews* 207: 19-30.
45. Schwarz K, van den Broek M, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, Kloetzel PM, Groettrup M (2000) Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *Journal of Immunology* 165: 768-778.
46. Nussbaum AK, Rodriguez-Carreno MP, Benning N, Botten J, Whitton JL (2005) Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8(+) T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *Journal of Immunology* 175: 1153-1160.
47. Chen WS, Norbury CC, Cho YJ, Yewdell JW, Bennink JR (2001) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *Journal of Experimental Medicine* 193: 1319-1326.
48. Hensley SE, Zanker D, Dolan BP, David A, Hickman HD, Embry AC, Skon CN, Grebe KM, Griffin TA, Chen WS, Bennink JR, Yewdell JW (2010) Unexpected Role for the Immunoproteasome Subunit LMP2 in Antiviral Humoral and Innate Immune Responses. *Journal of Immunology* 184: 4115-4122.
49. Caudill CM, Jayarapu K, Elenich L, Monaco JJ, Colbert RA, Griffin TA (2006) T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *Journal of Immunology* 176: 4075-4082.
50. Moebius J, van den Broek M, Groettrup M, Basler M (2010) Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice. *European Journal of Immunology* 40: 3439-3449.
51. Zaiss DMW, de Graaf N, Sijts AJAM (2008) The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infection and Immunity* 76: 1207-1213.
52. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, Sylvain C, Ring ER, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlati F, Demo SD, Bennett MK, Kirk CJ, Groettrup M (2009) A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature Medicine* 15: 781-U12.
53. Schmidt N, Gonzalez E, Visekruna A, Kuhl AA, Loddenkemper C, Mollenkopf H, Kaufmann SHE, Steinhoff U, Joeris T (2010) Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut* 59: 896-906.
54. Zaiss DM, Bekker CP, Grone A, Lie BA, Sijts AJ (2011) Proteasome Immunosubunits Protect against the Development of CD8 T Cell-Mediated Autoimmune Diseases. *J Immunol* . 10.4049/jimmunol.1101003 [doi].
55. Hayashi T, Faustman D (1999) NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology* 19: 8646-8659.
56. Cooper LT (2009) Medical Progress: Myocarditis. *New England Journal of Medicine* 360: 1526-1538.
57. Rose NR, Neumann DA, Herskowitz A (1992) Coxsackievirus Myocarditis. *Advances in Internal Medicine*, 37: 411-429.
58. Bowles NE, VandenVeyver IB, Ni JY, Weiner C, Carpenter RJ, Yankowitz J, Moise KJ, Henderson J, Towbin JA (1997) Detection of intrauterine viral infection using the polymerase

- chain reaction: Evidence for viral infection of the fetus as a cause of hydrops fetalis and myocarditis. *Pediatrics* 100: 434.
59. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M (2008) Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 118: 639-648.
 60. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U (2004) Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis - A comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* 109: 1250-1258.
 61. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK (2000) Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine* 342: 1077-1084.
 62. Mason JW, OConnell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE, Costanzo MR, Grady K, Kantrowitz NE, Zeldis SM, Kane S, Coglianese ME, Tomeo C, Bacon K, McLaughlin PR, Liu P, Ross B, Palacios IF, Dec W, Block B, Coccaspoffard D, Young JB, Leon C, Casta R, Kingry C, Strickman NE, Harlan M, Fowler N, Engel P, Nunn N, Das SK, Suhy P, Kline E, Gilles AJ, French WJ, Skinner A, Unverferth DV, Sarling R, Newton P, Woodingscott M, Untereker WJ, Poll D, Hoffman K, Frank J, Fowles R, Millar K, Freedman L, Lyver S, Latham R, Peeples R, Goldenberg IF, Hunn D, Anderson P, Weiss MB, Truelieb N, Hosenpud J, Conner R, Brown LJ, Ramanathan KB, Pounders C, Mills M, Kantor K, Abelmann WH, Flaherty A, Thorp K, Strain J, Virzi P, Grayeski A, Kelly A, Hobbs RE, Pelegrin D, Cohen M, Hawkins L, Kostuk WJ, Kennedy R, Hager WD, Dougherty J, Riba A, Larkin S, Kearny L, Davies RA, Drouin K, Matsumori A, Grose RM, Levine B, Uretsky BF, Murali S, Betschart A, Williams GA, Miller L, Wittry S, Hagan AD, Durham J, Shabetai R, Cremo R, McManus BM, Sears T, Arteaga W (1995) A Clinical-Trial of Immunosuppressive Therapy for Myocarditis. *New England Journal of Medicine* 333: 269-275.
 63. Yilmaz A, Mahrholdt H, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Meinhardt G, Voehringer M, Kispert EM, Deluigi C, Baccouche H, Spodarev E, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U (2008) Coronary vasospasm as the underlying cause for chest pain in patients with PVB19 myocarditis. *Heart* 94: 1456-1463.
 64. Deluigi CC, Ong P, Hill S, Wagner A, Kispert E, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Mahrholdt H (2011) ECG findings in comparison to cardiovascular MR imaging in viral myocarditis. *Int J Cardiol* . 10.1016/j.ijcard.2011.07.090 [doi].
 65. Lauer B, Niederau C, Kuhl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, Schultheiss HP (1997) Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology* 30: 1354-1359.
 66. Friedrich MG, Sechtem U, Schulz-Menger J, Holmvang G, Alakija P, Cooper LT, White JA, Abdel-Aty H, Gutberlet M, Prasad S, Aletras A, Laissy JP, Paterson I, Filipchuk NG, Kumar A, Pauschinger M, Liu P (2009) Cardiovascular Magnetic Resonance in Myocarditis: A JACC White Paper. *Journal of the American College of Cardiology* 53: 1475-1487.
 67. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R (2007) The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease - A scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation* 116: 2216-2233.
 68. Aretz HT (1987) Myocarditis - the Dallas Criteria. *Human Pathology* 18: 619-624.
 69. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, OConnell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P (1996) Report of the 1995 World Health Organization International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 93: 841-842.
 70. Esfandiarei M, McManus BM (2008) Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 3: 127-155.
 71. Rose NR (2008) Autoimmunity in coxsackievirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 323: 293-314.
 72. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R (1992) Ongoing Enterovirus-Induced Myocarditis Is Associated with Persistent Heart-Muscle Infection -

- Quantitative-Analysis of Virus-Replication, Tissue-Damage, and Inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 314-318.
73. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP (2005) High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 111: 887-893.
 74. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HPP (2005) Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 112: 1965-1970.
 75. Coyne CB, Bergelson JM (2006) Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124: 119-131.
 76. Honda T, Saitoh H, Masuko M, Katagiri-Abe T, Tominaga K, Kozakai I, Kobayashi K, Kumanishi T, Watanabe YG, Odani S, Kuwano R (2000) The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Molecular Brain Research* 77: 19-28.
 77. Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N (1988) Cap-Independent Translation of Poliovirus Messenger-Rna Is Conferred by Sequence Elements Within the 5' Noncoding Region. *Molecular and Cellular Biology* 8: 1103-1112.
 78. Wimmer E, Hellen CUT, Cao XM (1993) Genetics of Poliovirus. *Annual Review of Genetics* 27: 353-436.
 79. Vandyke TA, Flanagan JB (1980) Identification of Poliovirus Polypeptide P63 As A Soluble Rna-Dependent Rna-Polymerase. *Journal of Virology* 35: 732-740.
 80. Fuse K, Chan G, Liu YA, Gudgeon P, Husain M, Chen MY, Yeh WC, Akira S, Liu PP (2005) Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation* 112: 2276-2285.
 81. Wessely R, Klingel K, Knowlton KU, Kandolf R (2001) Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling - Implications for mortality and early viral replication. *Circulation* 103: 756-761.
 82. Deonarain R, Cerullo D, Fuse K, Liu PP, Fish EN (2004) Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation* 110: 3540-3543.
 83. Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, Okumura K, Naito S, Imataka K, Fujii J, Takaku F, Yazaki Y (1990) Expression of Major Histocompatibility Complex Class-I Antigen in Murine Ventricular Myocytes Infected with Coxsackievirus-B3. *Circulation Research* 67: 360-367.
 84. Wessely R, Klingel K, Santana LF, Dalton N, Hongo M, Lederer WJ, Kandolf R, Knowlton KU (1998) Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 102: 1444-1453.
 85. Garg A, Shiao J, Guyatt G (1998) The ineffectiveness of immunosuppressive therapy in lymphocytic myocarditis: An overview. *Annals of Internal Medicine* 129: 317-322.
 86. Huber SA (2006) Autoimmunity in coxsackievirus B3 induced myocarditis. *Autoimmunity* 39: 55-61.
 87. Gauntt CJ, Arizpe HM, Higdon AL, Wood HJ, Bowers DF, Rozek MM, Crawley R (1995) Molecular Mimicry, Anti-Coxsackievirus B3 Neutralizing Monoclonal-Antibodies, and Myocarditis. *Journal of Immunology* 154: 2983-2995.
 88. Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K (1993) Cytolytic Cross-Reactive Antibodies Directed Against the Cardiac Membrane and Viral-Proteins in Coxsackievirus B3 and B4 Myocarditis - Characterization and Pathogenetic Relevance. *Circulation* 87: 49-65.
 89. Caforio ALP, Grazzini M, Mann JM, Keeling PJ, Bottazzo GF, McKenna WJ, Schiaffino S (1992) Identification of Alpha-Cardiac and Beta-Cardiac Myosin Heavy-Chain Isoforms As Major Autoantigens in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 85: 1734-1742.
 90. Caforio AL, Tona F, Bottaro S, Vinci A, Dequal G, Daliento L, Thiene G, Iliceto S (2008) Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 41: 35-45.
 91. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU (1999) Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: Evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nature Medicine* 5: 320-326.

92. Szalay G, Meiners S, Voigt A, Lauber J, Spieth C, Speer N, Sauter M, Kuckelkorn U, Zell A, Klingel K, Stangl K, Kandolf R (2006) Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes. *American Journal of Pathology* 168: 1542-1552.
93. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL (1995) The Role of Cd8(+) T-Lymphocytes in Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *Journal of Virology* 69: 6720-6728.
94. Klingel K, Schnorr JJ, Sauter M, Szalay G, Kandolf R (2003) beta 2-microglobulin-associated regulation of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic coxsackievirus myocarditis. *American Journal of Pathology* 162: 1709-1720.
95. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
96. Peters B, Bulik S, Tampe R, van Endert PM, Holzhutter HG (2003) Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *Journal of Immunology* 171: 1741-1749.
97. Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE, Bui HH, Buus S, Frankild S, Greenbaum J, Lund O, Lundegaard C, Nielsen M, Ponomarenko J, Sette A, Zhu Z, Peters B (2008) Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Research* 36: W513-W518.
98. Voigt A, Jakel S, Textoris-Taube K, Keller C, Drung I, Szalay G, Klingel K, Henklein P, Stangl K, Kloetzel PM, Kuckelkorn U (2010) Generation of in silico predicted coxsackievirus B3-derived MHC class I epitopes by proteasomes. *Amino Acids* 39: 243-255.
99. Shin EC, Seifert U, Kato T, Rice CM, Feinstone SM, Kloetzel PM, Rehmann B (2006) Virus-induced type IIFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *Journal of Clinical Investigation* 116: 3006-3014.
100. Strehl B, Textoris-Taube K, Jakel S, Voigt A, Henklein P, Steinhoff U, Kloetzel PM, Kuckelkorn U (2008) Antitopes define preferential proteasomal cleavage site usage. *Journal of Biological Chemistry* 283: 17891-17897.
101. Jakel S, Kuckelkorn U, Szalay G, Plotz M, Textoris-Taube K, Opitz E, Klingel K, Stevanovic S, Kandolf R, Kotsch K, Stangl K, Kloetzel PM, Voigt A (2009) Differential Interferon Responses Enhance Viral Epitope Generation by Myocardial Immunoproteasomes in Murine Enterovirus Myocarditis. *American Journal of Pathology* 175: 510-518.
102. Deol P, Zaiss DMW, Monaco JJ, Sijts AJAM (2007) Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *Journal of Immunology* 178: 7557-7562.
103. Weinzierl AO, Szalay G, Wolburg H, Sauter M, Rammensee HG, Kandolf R, Stevanovic S, Klingel K (2008) Effective chemokine secretion by dendritic cells and expansion of cross-presenting CD4(-)/CD8(+) dendritic cells define a protective phenotype in the mouse model of coxsackievirus myocarditis. *Journal of Virology* 82: 8149-8160.
104. Lelouard H, Ferrand V, Marguet D, Bania J, Camosseto V, David A, Gatti E, Pierre P (2004) Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *Journal of Cell Biology* 164: 667-675.
105. Ebstein F, Lange N, Urban S, Seifert U, Kruger E, Kloetzel PM (2009) Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 1205-1215.
106. Lelouard H, Ferrand V, Marguet D, Bania J, Camosseto V, David A, Gatti E, Pierre P (2004) Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *Journal of Cell Biology* 164: 667-675.
107. Herter S, Osterloh P, Hilf N, Rechtsteiner G, Hohfeld J, Rammensee HG, Schild H (2005) Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *Journal of Immunology* 175: 891-898.
108. Rahnefeld A, Ebstein F, Albrecht N, Opitz E, Kuckelkorn U, Stangl K, Rehm A, Kloetzel PM, Voigt A (2011) Antigen-presentation capacity of dendritic cells is impaired in ongoing enterovirus myocarditis. *Eur J Immunol*, doi: 10.1002/eji.201041039.

109. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schroter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Kruger E (2010) Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* 142: 613-624.
110. Opitz E, Koch A, Klingel K, Schmidt F, Prokop S, Rahnefeld A, Sauter M, Heppner FL, Volker U, Kandolf R, Kuckelkorn U, Stangl K, Kruger E, Kloetzel PM, Voigt A (2011) Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. *Plos Pathogens* 7: 1-13.
111. Yewdell JW (2007) Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Current Opinion in Immunology* 19: 79-86.
112. Gomes AV, Zong C, Edmondson RD, Li X, Stefani E, Zhang J, Jones RC, Thyparambil S, Wang GW, Qiao X, Bardag-Gorce F, Ping PP (2006) Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circulation Research* 99: 362-371.
113. Rahnefeld, A (2011) Charakterisierung Dendritischer Zellen in der frühen Enterovirusmyokarditis [Dissertation]. Charité Universitätsmedizin Berlin.
114. Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Van Kaer L, Monaco JJ, Colbert RA (1998) Immunoproteasome assembly: Cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *Journal of Experimental Medicine* 187: 97-104.
115. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL (1993) Gamma-Interferon and Expression of Mhc Genes Regulate Peptide Hydrolysis by Proteasomes. *Nature* 365: 264-267.
116. Eggers M, Boesfabian B, Ruppert T, Kloetzel PM, Koszinowski UH (1995) The Cleavage Preference of the Proteasome Governs the Yield of Antigenic Peptides. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1865-1870.
117. Toes REM, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NPN, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2001) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *Journal of Experimental Medicine* 194: 1-12.
118. Kembell CC, Harkins S, Whitton JL (2008) Enumeration and functional evaluation of virus-specific CD4(+) and CD8(+) T cells in lymphoid and peripheral sites of coxsackievirus B3 infection. *Journal of Virology* 82: 4331-4342.
119. Cornell CT, Mosses WB, Harkins S, Whitton L (2007) Coxsackievirus B3 proteins directionally complement each other to downregulate surface major histocompatibility complex class I. *Journal of Virology* 81: 6785-6797.
120. Prestwich RJ, Errington F, Ilett EJ, Morgan RSM, Scott KJ, Kottke T, Thompson J, Morrison EE, Harrington KJ, Pandha HS, Selby PJ, Vile RG, Melcher AA (2008) Tumor Infection by Oncolytic Reovirus Primes Adaptive Antitumor Immunity. *Clinical Cancer Research* 14: 7358-7366.
121. Gomes AV, Zong C, Edmondson RD, Li X, Stefani E, Zhang J, Jones RC, Thyparambil S, Wang GW, Qiao X, Bardag-Gorce F, Ping PP (2006) Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circulation Research* 99: 362-371.
122. Ishii K, Hisaeda H, Duan XF, Imai T, Sakai T, Fehling HJ, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Hamano S, Sano M, Yano A, Himeno K (2006) The involvement of immunoproteasomes in induction of MHC class I-restricted immunity targeting Toxoplasma SAG1. *Microbes and Infection* 8: 1045-1053.
123. Chou B, Hisaeda H, Shen JY, Duan XF, Imai T, Tu LP, Murata S, Tanaka K, Himeno K (2008) Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. *Microbes and Infection* 10: 241-250.
124. Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumfheller C, Siegal FP, Steinman RM (2004) HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7669-7674.
125. Zimmermann M, Flechsig C, La Monica N, Tripodi M, Adler G, Dikopoulos N (2008) Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes. *Journal of Hepatology* 48: 51-60.

126. Krausslich HG, Nicklin MJH, Toyoda H, Etchison D, Wimmer E (1987) Poliovirus Proteinase-2A Induces Cleavage of Eukaryotic Initiation Factor-4F Polypeptide-P220. *Journal of Virology* 61: 2711-2718.
127. Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N (1998) Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11089-11094.
128. Gabriele L, Ozato K (2007) The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18: 503-510.
129. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, Osiak A, Levine B, Schmidt RE, Garcia-Sastre A, Leib DA, Pekosz A, Knobeloch KP, Horak I, Virgin HW (2007) IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1371-1376.
130. Lai C, Struckhoff JJ, Schneider J, Martinez-Sobrido L, Wolff T, Garcia-Sastre A, Zhang DE, Lenschow DJ (2009) Mice Lacking the ISG15 E1 Enzyme Ube1L Demonstrate Increased Susceptibility to both Mouse-Adapted and Non-Mouse-Adapted Influenza B Virus Infection. *Journal of Virology* 83: 1147-1151.
131. Riad A, Westermann D, Zietsch C, Savvatis K, Becher PM, Bereswill S, Heimesaat MM, Lettau O, Lassner D, Dorner A, Poller W, Busch M, Felix SB, Schultheiss HP, Tschöpe C (2011) TRIF Is a Critical Survival Factor in Viral Cardiomyopathy. *Journal of Immunology* 186: 2561-2570.
132. Fairweather D, Yusung S, Frisancho S, Barrett M, Gatewood S, Steele R, Rose NR (2003) IL-12 receptor beta 1 and Toll-like receptor 4 increase IL-1 beta- and IL-18-associated myocarditis and Cocksackievirus replication. *Journal of Immunology* 170: 4731-4737.
133. Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP (2003) Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 107: 2793-2798.
134. Watanabe Y, Suzuki O, Haruyama T, Akaike T (2003) Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry* 89: 244-253.
135. Beck MA, Handy J, Levander OA (2000) The role of oxidative stress in viral infections. *Neuroimmunomodulation* 917: 906-912.
136. Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426: 895-899.
137. Szeto J, Kaniuk NA, Canadien V, Nisman R, Mizushima N, Yoshimori T, Bazett-Jones DP, Brumell JH (2006) ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy* 2: 189-199.
138. Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, Kaufmann SHE, Schmidt-Ullrich R, Steinhoff U (2006) Proteasome-mediated degradation of I kappa B alpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *Journal of Clinical Investigation* 116: 3195-3203.
139. Hayashi T, Faustman D (2000) Essential role of human leukocyte antigen-encoded proteasome subunits in NF-kappa B activation and prevention of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5238-5247.
140. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi N, Treon SP, Anderson KC (2002) Biologic sequelae of nuclear factor-kappa B blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 99: 4079-4086.
141. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M (2011) NF-kappa B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Research* 21: 146-158.
142. Piccinini AM, Midwood KS (2010) DAMPENing Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation*.
143. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC (2005)

- Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* 352: 2487-2498.
144. Basler M, Dajee M, Moll C, Groettrup M, Kirk CJ (2010) Prevention of Experimental Colitis by a Selective Inhibitor of the Immunoproteasome. *Journal of Immunology* 185: 634-641.
 145. Agarwal AK, Xing C, DeMartino GN, Mizrahi D, Hernandez MD, Sousa AB, de Villarreal LM, dos Santos HG, Garg A (2010) PSMB8 Encoding the beta 5i Proteasome Subunit Is Mutated in Joint Contractures, Muscle Atrophy, Microcytic Anemia, and Panniculitis-Induced Lipodystrophy Syndrome. *American Journal of Human Genetics* 87: 866-872.
 146. Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura KI (2011) Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10.1073/pnas.1106015108 [doi].
 147. Yang G, Fu YN, Faustman DL (1997) Reduced expression of Tap1 and Lmp2 antigen-processing genes in the nonobese diabetic (NOD) mouse due to a mutation in their shared bidirectional promoter. *Journal of Immunology* 159: 3068-3080.
 148. Krause S, Kuckelkorn U, Dorner T, Burmester GR, Feist E, Kloetzel PM (2006) Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65: 1021-1027.
 149. Goser S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, Zittrich S, Blaudeck N, Hardt SE, Pfitzer G, Rose NR, Katus HA, Kaya Z (2006) Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation* 114: 1693-1702.

Danksagung

Mein herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Gert Baumann und Herrn Prof. Dr. Karl Stangl, die mir stets das Vertrauen geschenkt haben, meine Projekte selbständig realisieren zu können und die mir dazu den wissenschaftlichen Freiraum eingeräumt haben. Ich möchte mich bei Ihnen für die Überlassung eines Forschungslabors sowie die inhaltliche und finanzielle Unterstützung herzlich bedanken.

Mein ganz besonderes Dankeschön gilt meinem geistigen Ziehvater und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel, der mich als junge Medizinstudentin in sein Labor aufgenommen und meinen Werdegang über alle Berg- und Talfahrten hinweg entscheidend geprägt hat. Bei ihm und seinen Mitarbeitern habe ich die Güte des wissenschaftlichen Arbeitens schätzen lernen dürfen. Ein Satz wird mir immer im Gedächtnis bleiben: „Antje, uns unterscheidet nicht der Titel oder Bildungsstatus, sondern das Alter.“ Mit eben dieser Wertschätzung, der damit verbundenen Motivation und Anspruchshaltung bin ich Herrn Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel über alle Jahre begegnet.

Gleichzeitig richtet sich mein herzliches Dankeschön an Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn, die mich während meiner Promotion im biochemischen Forschungslabor mit viel Ruhe und Liebe zum Detail betreut hat. Ihr verdanke ich meine biochemische Ausbildung und natürlich die Fähigkeit, das 20S Proteasom nach aufwendiger Prozedur hoch rein in der Hand halten zu dürfen.

Durch das Mentoring-Programm der Charité Universitätsmedizin Berlin habe ich Herrn Prof. Dr. Gerd Heusch kennen gelernt. Der offene Gesprächscharakter machte jedes unserer Treffen zu einem persönlichen Gewinn. Die Gesprächsinhalte waren Grundlage vieler persönlicher Gedankenprozesse. Ich danke Herrn Prof. Dr. Heusch sehr herzlich für sein persönliches Engagement und seinen Respekt gegenüber meinen Entscheidungen.

Mein herzliches Dankeschön möchte ich allen Mitarbeiterinnen meiner Arbeitsgruppe aussprechen: Nadine Albrecht, Dr. med. Katrin Bartel, Nicola Diny (M.Sc.), Nakeisha George (M.Sc.), Grit Hoyer (cand.-med. Dipl.-troph.), Elisa Opitz (M.Sc.), Dr. med. Anna Rahnefeld (cand.-med.). Natürlich sind sie alle für die Realisierung meiner Projekte entscheidend gewesen.

Über viele Jahre habe ich mit vielen Mitarbeitern aus dem Institut für Biochemie der Charité sehr fruchtbar zusammengearbeitet. An dieser Stelle gilt mein herzliches Dankeschön Prof. Dr. Burkhardt Dahmann, Ilse Drung, Dr. Frédéric Ebstein, Daniela Ludwig, Prof. Dr. Elke Krüger, PD Dr. Ulrike Seifert sowie Kathrin Textoris-Taube.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei meinen anderen Kooperationspartnern bedanken: Dr. Dr. Karl Egerer, Prof. Dr. Frank Heppner, Prof. Dr. Reinhard Kandolf, Prof. Dr. Karin Klingel, Prof. Dr. Katja Kotsch, Dr. Stefan Prokop, Dr. Kostas Savvatis, Dr. Frank Schmidt, PD Dr. Carsten Skurk, Prof. Dr. Alexander Staudt, Dr. Gudrun Szalay, Prof. Dr. Carsten Tschöpe, Prof. Dr. Uwe Völker, Dr. Dirk Westermann. Dabei gilt mein besonderes Dankeschön Frau Prof. Dr. Karin Klingel, die uns mit ihrer Expertise in der Molekularpathologie der CVB3-Myokarditis sehr unterstützt hat. Sehr herzlich möchte ich mich bei Bianca Verret, Dr. Renate Thiel und Thomas Strandt (Forschungseinrichtung Experimentelle Medizin der Charité) bedanken.

Mein persönliches Dankeschön gilt zudem Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiß, Prof. Dr. Wolfgang Poller sowie Heiderose Kuhn vom SFB/TR19. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiß für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung durch das Gerok-Rotationsprogramm des SFB/TR.

Der Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin bin ich für die Unterstützung durch das Rahel-Hirsch-Habilitations-Stipendium, das Mentoring-Programm und das Lydia-Rabinowitsch-Stipendium herzlich dankbar.

Diese wissenschaftliche Arbeit setzt eine uneingeschränkte Unterstützung im Privatleben voraus. Mein innigster Dank gehört dabei Mark, dessen Liebe, Wertschätzung, Toleranz und Hilfe in Konfliktsituation mein Leben täglich bereichern. Ebenso möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern Uta und Achim bedanken. Sie haben uns in jeder Lebenslage unterstützt. Und natürlich darf auch unser kleiner Sonnenschein Peter Konrad nicht unerwähnt bleiben: in seiner peripartalen Lebensphase hat er die letzten Züge dieser Arbeit in entscheidenden Momenten passiv, aber dann auch aktiv auf seine Art begleitet.

Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

Unterschrift