

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-apoptotischen [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 Immunountereinheiten-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 suszeptible 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 -

- 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