

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des Immunoproteasoms bei der Expressionskontrolle
von Pentraxin3

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Possehl

aus Rostock

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	3
2. Abstract.....	5
3. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung.....	7
4. Auszug der Journal Summary List.....	9
5. Publikation.....	10
6. Lebenslauf.....	32
7. Publikationsliste.....	33
8. Danksagung.....	34

1. Zusammenfassung

Hintergrund. Das Proteasom, eine multikatalytische Protease, degradiert an Ubiquitin gebundene Proteine. Es ist entscheidend für den zellulären Metabolismus und die Regulation intrazellulärer Signalwege. In Immunzellen und unter Einfluss inflammatorischer Zytokine wird anstelle des Standardproteasoms eine spezielle Isoform, das Immunoproteasom, gebildet. Die beiden Isoformen scheinen sich in Bezug auf die Quantität bei der Generierung von Peptidfragmenten und Kinetik bei der Proteolyse zu unterscheiden. Das Immunoproteasom unterstützt durch effektive MHC I Epitop-Generierung die CD8⁺-abhängige Immunantwort. Es beeinflusst die Differenzierung CD4-positiver T-Zellen und die Produktion inflammatorischer Zytokine. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Immunoproteasom für die Regulation der Entzündungsantwort und die Vitalität von Kardiomyozyten im Mausmodell der CoxsackievirusB3 (CVB3)-induzierten Myokarditis von Bedeutung ist. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss der proteolytischen Immunoproteasomaktivität auf die Expression des löslichen Pattern-Recognition Receptors Pentraxin3 (PTX3) und dessen mögliche immunregulatorische Funktion auf die Entzündung im Herzen.

Methoden. CVB3-infizierte Mäuse entwickeln nach einigen Tagen eine akute Myokarditis. Tiere mit einem Gendefekt für PTX3 bzw. für die proteasomale Immununtereinheit LMP7 wurden mit ihren Wildtyp-Kontrollen hinsichtlich der Histologie, Viruslast, serologischen und klinischen Parameter bzw. PTX3-Expression verglichen. Nach TLR4-Stimulation kultivierter Makrophagen wurden mRNA- und Proteinexpression in Abhängigkeit von LMP7-Defizienz bzw. -Aktivität untersucht.

Ergebnisse. Makrophagen waren vorrangig an der induzierbaren Expression von PTX3 im entzündeten Herzmuskel beteiligt. Obwohl PTX3 als Opsonin für diverse Pathogene bekannt ist, konnten wir weder eine Interaktion zwischen PTX3 und CVB3 noch einen Einfluss auf die Virusreplikation und -last ausmachen. Dennoch ging ein homozygoter PTX3-Gendefekt mit einer vermehrten Apoptose in entzündeten Herzanteilen, erhöhter Kreatinkinaseaktivität im Serum und einem erhöhten Lungenfeuchtgewicht, als mögliches Zeichen eines Volumenrückstaus in die Lungen, einher. Die proteolytische Aktivität des Immunoproteasoms führte zu einer erhöhten PTX3-Expression im entzündeten Herzen. Zellkulturexperimente mit Makrophagen bekräftigten die Rolle der katalytischen Aktivität von LMP7 für die Transkriptionskontrolle des PTX3-Gens. Bei der Untersuchung übergeordneter Signalwege, welche zu einer PTX3-Induktion in

Makrophagen führen, zeigte sich bei intakter Immunoproteasom-Funktion eine vermehrte Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2. Die Aktivierung von p38 und ERK1/2 trug zur TLR4-abhängigen Induktion der PTX3-Expression in Makrophagen bei.

Zusammenfassung. Diese Arbeit stellt einen möglichen Regulationsmechanismus heraus, wie die Proteolyse durch das Immunoproteasom im Vergleich zum Standardproteasom den Verlauf der viralen Myokarditis beeinflusst. Die katalytische Aktivität der Immununtereinheit LMP7 verstärkt die Phosphorylierung von p38 und ERK1/2, welche an der induzierbaren PTX3-Expression in Makrophagen beteiligt sind. Bei der akuten Myokarditis sind das Fehlen des intakten Immunoproteasoms mit einer reduzierten lokalen PTX3-Expression und eine PTX3-Defizienz mit einem größeren Gewebeschaden assoziiert.

2. Abstract

Background. The proteasome is a protease that degrades ubiquitin-tagged proteins. It is essential for maintaining cellular processes and regulating signaling pathways. In hematopoietic cells and upon exposure to inflammatory cytokines standard-proteasomes are replaced by a specific isoform, the so-called immunoproteasome. These isoforms appear to exhibit quantitative differences in peptide generation. Aside from facilitating MHC class I restricted epitope production and thereby CD8⁺-dependent immune responses, the immunoproteasome affects T-helper-cell differentiation and proinflammatory cytokine production. Our group reported previously on its functional role in preventing an excessive inflammation and cardiomyocyte death in a mouse model of CVB3-myocarditis. Here we investigated the role of immunoproteasome function in expression control of the soluble pattern recognition receptor Pentraxin3 (PTX3). We examined the contribution of PTX3 to the anti-inflammatory effects.

Methods. Mice were infected with cardiotropic CVB3. They developed an acute myocarditis. PTX3-deficient mice and their wild-type littermates were examined by histology, viral burden, serological and clinical markers. PTX3 expression was monitored in mice deficient for the proteasomal immunosubunit LMP7 and wild-type controls. PTX3 induction in bone marrow-derived macrophages via TLR4 engagement was examined at mRNA and protein level.

Main results. PTX3 shows an interstitial distribution at sites of inflammation with macrophages being the main source. Although PTX3 is known for opsonization of various pathogens, we failed to show a binding between PTX3 and CVB3. Also no effect on viral replication or titers was found. However ablation of PTX3 was associated with apoptotic cell death in inflammatory lesions, elevated serum creatine kinase and increased wet lung weights, as a potential sign of fluid retention in the lung. Immunoproteasome function showed to be crucial for cardiac PTX3 expression during acute myocarditis. In cell-cultured macrophages the catalytic activity of the LMP7 subunit was important for PTX3 transcription control. In an effort to analyze signaling pathways that are involved in PTX3 induction, we found an increased phosphorylation of p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein kinases in the presence of intact immunoproteasomes. Both p38 and ERK1/2 showed a functional role in inducible PTX3 expression in macrophages.

Conclusions. Our findings reveal a potential regulatory mechanism of immunoproteasome function to control the course of viral myocarditis. The catalytic activity of the immunoproteasome subunit LMP7 affects phosphorylation of p38 and ERK1/2 MAP kinases that are involved in PTX3 expression control. Ablation of intact immunoproteasomes reduces local PTX3 synthesis and PTX3-deficiency promotes heart tissue inflammation in the model of viral myocarditis.

3. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Anna Possehl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Die Rolle des Immunoproteasoms bei der Expressionskontrolle von Pentraxin3* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Paeschke A*, **Possehl A***, Klingel, K., Voss, M., Voss, K., Kespohl, M., Sauter, M., Overkleeft, H. S., Althof, N., Garlanda, C. and Voigt, A. (2016), The immunoproteasome controls the availability of the cardioprotective pattern recognition molecule Pentraxin3. Eur. J. Immunol., 46: 619–633. doi:10.1002/eji.201545892

*equal contribution

Beitrag im Einzelnen:

Planung des Experimente: alle Abbildungen

Durchführung des Experimente: in vivo Versuch Abb. 1, in vivo Versuch Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4, Abb. 5A-C, Abb. 6

Datenanalyse: alle Abbildungen

Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskripts

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4. Auszug der Journal Summary List

ISI Web of KnowledgeSM
 Journal Citation Reports[®]
 WELCOME ? HELP MARKED LIST
 2014 JCR Science Edition
 Journal Summary List [Journal Title Changes](#)
 Journals from: subject categories IMMUNOLOGY [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)
 Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 148) Page 1 of 8
 MARK ALL UPDATE MARKED LIST
Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data ^j						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	ANNU REV IMMUNOL	0732-0582	16750	39.327	46.694	5.636	22	9.2	0.04556	23.711
<input type="checkbox"/>	2	NAT REV IMMUNOL	1474-1733	28938	34.985	37.316	5.783	60	6.4	0.09492	17.478
<input type="checkbox"/>	3	IMMUNITY	1074-7613	37232	21.561	21.003	5.007	149	6.5	0.14627	11.660
<input type="checkbox"/>	4	NAT IMMUNOL	1529-2908	35403	20.004	23.956	4.322	121	6.4	0.13523	12.884
<input type="checkbox"/>	5	J EXP MED	0022-1007	62917	12.515	13.244	2.351	188	>10.0	0.12007	6.843
<input type="checkbox"/>	6	J ALLERGY CLIN IMMUN	0091-6749	38706	11.476	10.715	3.044	316	6.5	0.07986	3.118
<input type="checkbox"/>	7	TRENDS IMMUNOL	1471-4906	8931	10.399	10.527	2.182	66	6.8	0.02661	4.555
<input type="checkbox"/>	8	IMMUNOL REV	0105-2896	12935	10.120	11.151	2.581	93	6.2	0.04256	5.010
<input type="checkbox"/>	9	CLIN INFECT DIS	1058-4838	51710	8.886	9.206	2.596	468	7.0	0.12680	3.562
<input type="checkbox"/>	10	J AUTOIMMUN	0896-8411	4722	8.410	6.330	1.840	106	4.4	0.01157	1.601
<input type="checkbox"/>	11	AUTOIMMUN REV	1568-9972	6156	7.933	5.959	2.976	169	3.5	0.01530	1.405
<input type="checkbox"/>	12	SEMIN IMMUNOPATHOL	1863-2297	2008	7.748	7.047	1.133	45	3.4	0.00913	2.478
<input type="checkbox"/>	13	CURR OPIN IMMUNOL	0952-7915	8513	7.478	7.572	1.542	96	6.3	0.02733	3.316
<input type="checkbox"/>	14	MUCOSAL IMMUNOL	1933-0219	3141	7.374	6.994	2.039	129	3.1	0.01550	2.813
<input type="checkbox"/>	15	EMERG INFECT DIS	1080-6040	24477	6.751	6.519	1.917	315	6.3	0.05932	2.195
<input type="checkbox"/>	16	ONCOIMMUNOLOGY	2162-4011	2080	6.266	6.269	1.525	80	1.9	0.00694	1.400
<input type="checkbox"/>	17	ALLERGY	0105-4538	13418	6.028	5.948	1.963	190	6.4	0.02538	1.605
<input type="checkbox"/>	18	J INFECT DIS	0022-1899	44607	5.997	5.862	2.141	538	8.7	0.09429	2.296
<input type="checkbox"/>	19	ADV IMMUNOL	0065-2776	2270	5.962	6.974	1.880	25	7.9	0.00638	3.494
<input type="checkbox"/>	20	BRAIN BEHAV IMMUN	0889-1591	8218	5.889	5.895	1.278	205	4.7	0.02239	1.728

Journals 21 - 40 (of 148) Page 2 of 8
 MARK ALL UPDATE MARKED LIST
Ranking is based on your journal and sort selections.

<input type="checkbox"/>	21	AIDS	0269-9370	22502	5.554	5.785	1.467	353	6.9	0.05438	2.167
<input type="checkbox"/>	22	CLIN REV ALLERG IMMUN	1080-0549	1925	5.463	4.444	0.926	54	4.1	0.00489	1.150
<input type="checkbox"/>	23	J NEUROINFLAMM	1742-2094	5318	5.408	5.632	0.605	215	3.2	0.01820	1.524
<input type="checkbox"/>	24	SEMIN IMMUNOL	1044-5323	3502	5.170	5.504	1.524	63	6.7	0.00956	2.448
<input type="checkbox"/>	25	J INT AIDS SOC	1758-2652	1448	5.090	4.903	0.620	92	3.0	0.00759	1.714
<input type="checkbox"/>	26	J IMMUNOL	0022-1767	124744	4.922	5.264	0.959	1222	8.6	0.23698	2.018
<input type="checkbox"/>	27	CLIN EXP ALLERGY	0954-7894	10303	4.769	4.501	1.213	136	7.7	0.01771	1.301
<input type="checkbox"/>	28	CURR OPIN HIV AIDS	1746-630X	1668	4.680	3.879	1.079	76	3.2	0.00882	1.497
<input type="checkbox"/>	29	JAIDS-J ACQ IMM DEF	1525-4135	14351	4.556	4.531	1.226	337	6.1	0.03930	1.674
<input type="checkbox"/>	30	J INNATE IMMUN	1662-811X	1360	4.352	4.484	1.096	73	3.5	0.00689	1.523
<input type="checkbox"/>	31	J LEUKOCYTE BIOL	0741-5400	16298	4.289	4.705	0.701	197	8.1	0.02970	1.713
<input type="checkbox"/>	32	VIRULENCE	2150-5594	1298	4.216	3.672	1.964	84	2.4	0.00593	1.212
<input type="checkbox"/>	33	EXPERT REV VACCINES	1476-0584	3147	4.210	3.879	0.898	118	4.2	0.01064	1.205
<input type="checkbox"/>	34	EXERC IMMUNOL REV	1077-5552	529	4.176	6.071	0.000	8	6.6	0.00105	1.580
<input type="checkbox"/>	35	IMMUNOL CELL BIOL	0818-9641	3818	4.147	3.566	1.464	97	6.6	0.01002	1.375
<input type="checkbox"/>	36	CELL MOL IMMUNOL	1672-7681	1744	4.112	3.526	1.172	58	4.6	0.00519	1.116
<input type="checkbox"/>	37	INT REV IMMUNOL	0883-0185	1062	4.103	4.730	0.771	35	5.1	0.00299	1.494
<input type="checkbox"/>	38	CURR TOP MICROBIOL	0070-217X	5106	4.097	4.149	0.367	128	6.7	0.01328	1.637
<input checked="" type="checkbox"/>	39	EUR J IMMUNOL	0014-2980	20513	4.034	4.278	0.984	322	8.5	0.04363	1.690
<input type="checkbox"/>	40	J IMMUNOTHER	1524-9557	2767	4.008	3.478	0.673	52	6.0	0.00630	1.014

Abb. 1: das Eur. J. Immunol. gehört zu den ersten, nach Impact Factor sortierten, 30% der Journals auf dem Fachgebiet Immunologie (Platz 39 von 148), Stand 11/2015.

5. Publikation

Paeschke, A., Possehl, A., Klingel, K., Voss, M., Voss, K., Kespohl, M., Sauter, M., Overkleeft, H. S., Althof, N., Garlanda, C. and Voigt, A. (2016), The immunoproteasome controls the availability of the cardioprotective pattern recognition molecule Pentraxin3. *Eur. J. Immunol.*, 46: 619–633. doi:10.1002/eji.201545892

<http://dx.doi.org/10.1002/eji.201545892>

6. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7. Publikationsliste

Publikation

Paeschke A*, Possehl A*, Klingel, K., Voss, M., Voss, K., Kespohl, M., Sauter, M., Overkleeft, H. S., Althof, N., Garlanda, C. and Voigt, A. (2016), The immunoproteasome controls the availability of the cardioprotective pattern recognition molecule Pentraxin3. Eur. J. Immunol., 46: 619–633. doi:10.1002/eji.201545892

*equal contribution

Poster

25.06.2014 1. DZHK-Lecture, Berlin

„Immunoproteasomes regulate the pattern recognition molecule Pentraxin3 during inflammation”

Possehl A, Rahnefeld A, Klingel K, Voigt A.

18.09.2014 44th Annual Meeting of German Society for Immunology (DGfI), Bonn

„Evidence for a key role of immunoproteasome function in the regulation of the pattern recognition molecule Pentraxin3”

Possehl A, Rahnefeld A, Klingel K, Voigt A.

8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Antje Beling für die Ermöglichung dieser Promotion. Neben der Gelegenheit zu diesem interessanten Thema zu forschen erhielt ich auch eine großartige Betreuung. Zu jeder Zeit des Diskussionsbedarfs gab es ein offenes Ohr und wertvolle Vorschläge.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anna Paeschke. Seit meiner ersten Minute im Labor bis zur Fertigstellung dieser Arbeit stand sie mir zur Seite. Den Großteil meiner im Labor erworbenen Fertigkeiten verdanke ich ihrer Geduld und Hilfsbereitschaft. Ihre Begeisterung für die Laborarbeit und Forschung war für mich immer eine Motivation.

Der Arbeitsgruppe danke ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre. In stressigen Situationen gab es immer eine helfende Hand, die mich unterstützte. Vor allem danke ich Dr. Nadine Althof und Anika Lindner für das Lehren der Methodik.

Ich danke Felicia Kirschner für die Bereitschaft ihre Erfahrungen mit der Kultivierung von Makrophagen zu teilen.

Ich danke meiner Familie und dir, Rico, dass ihr mich in jeder Lebenslage unterstützt und mir Studium und Promotion ermöglicht habt.