

Aus dem CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt

Rheumatologie und Klinische Immunologie (CCM)

Direktor: Prof. Dr. med. Gerd-Rüdiger Burmester

## **Habilitationsschrift**

### **PROTEASOMEN UND AUTOIMMUNITÄT**

zur Erlangung der Lehrfähigkeit

für das Fach

**INNERE MEDIZIN**

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Herrn Dr. med. Eugen Feist**

geboren am 19.12.1969 in Krasnojarsk

eingereicht am: Dezember 2007

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Joachim R. Kalden

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

## INHALTSVERZEICHNIS

### **1. Einführung und Zielstellung**

1.1 Aufbau und Bedeutung des Ubiquitin-Proteasomensystems	4
1.2 Immunsystem und Proteasomen	6
1.3 Systemische Autoimmunerkrankungen	10
1.4 Aktuelle Konzepte zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der B-Zellfunktion	11
1.5 Zielstellung der Arbeit	15

### **2. Charakteristika der untersuchten Patienten und Kontrollen** 18

### **3. Angewandte Methoden zur Untersuchung des Proteasomensystems**

3.1 Proteasomenaufreinigung und Proteaseassay	19
3.2 Immunoassays zum Nachweis von Anti-Proteasomen-Antikörpern	20
3.3 Isolierung und Charakterisierung von Anti-Proteasomen-Antikörpern	21
3.4 Nachweis und Charakterisierung von 20S Proteasomen im Serum und Plasma	22
3.5. Expression von Proteasomen auf mRNA und Proteinebene	23
3.6. Statistische Methoden	25

### **4. Ergebnisse**

4.1 Diversität der humoralen Immunantwort gegen 20S Proteasomen bei Autoimmunerkrankungen	26
4.2 Antikörper gegen 20S Proteasom gehören zu den Anti-nukleären Antikörpern	48
4.3 Inhibition der Proteasomenaktivität durch Anti-Proteasomen-Antikörper	57
4.4 Zirkulierende 20S Proteasomen als Marker für Entzündung und Zelluntergang	69
4.5 Untersuchungen zur Expression von Proteasomenuntereinheiten bei Autoimmunerkrankungen	80

<b>5. Diskussion</b>	
5.1 Das Ubiquitin-Proteasomensystems in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen	99
<b>6. Zusammenfassung</b>	105
<b>7. Literatur</b>	107
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	113
<b>9. Danksagung</b>	116
<b>10. Erklärung</b>	117

## 1. Einführung und Zielstellung

### 1.1 Aufbau und Bedeutung des Ubiquitin-Proteasomensystems

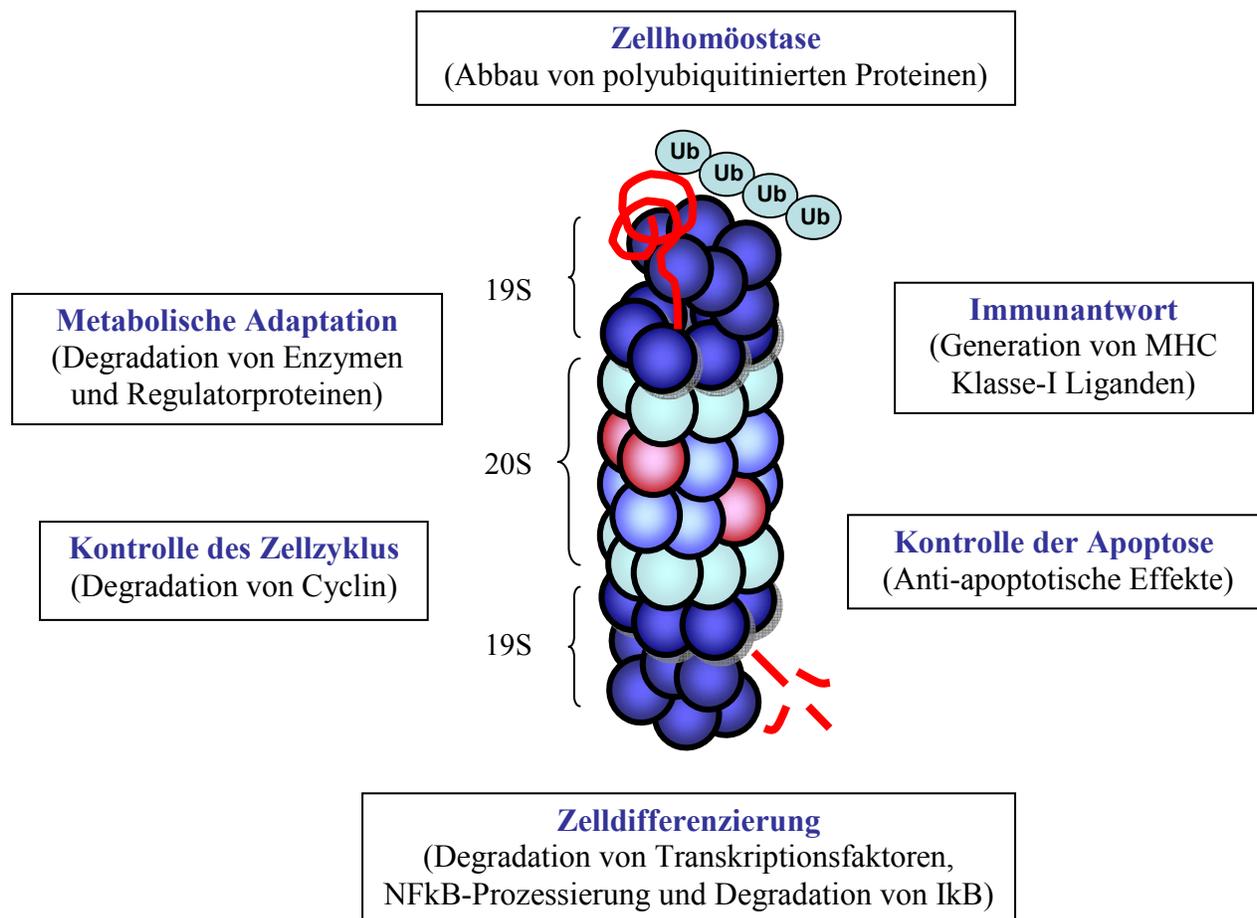
Das Ubiquitin-Proteasomensystem spielt eine Hauptrolle im nichtlysosomalen, intrazellulären Proteinabbau, wodurch es essentiell zum Erhalt der Zellhomöostase beiträgt. Darüber hinaus werden kurzlebige Regulatoren des Zellzyklus (z.B. Cyclin) abgebaut sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. NF $\kappa$ B) teilprozessiert und damit aktiviert [Muratani und Tansey 2003; Seufert und Jentsch 1992]. Die jeweiligen Substrate werden vor Degradation durch das Proteasom zunächst ATP-abhängig mittels Polyubiquitinylierung markiert. Dazu werden Ubiquitinmoleküle durch eine E1-Ligase aktiviert, anschließend auf eine E2-Ligase transferiert und mit Hilfe einer E3-Ligase an das abzubauen Substrat kovalent gebunden.

Der katalytische Kernkomplex des Ubiquitin-Proteasomensystems wird durch das 20S Proteasom gebildet. Diese in eukaryontischen Zellen hochkonservierte und abundante Protease (ca. 700 kDa) weist eine zylindrische Struktur auf, die von vier heptameren Ringen gebildet wird [Groll et al. 1997]. Von den Untereinheiten der inneren Ringe ( $\beta$ 1 bis  $\beta$ 7) weisen jeweils drei eine ATP-unabhängige proteolytische Aktivität auf, wobei ein Threoninrest in Position 1 essentiell ist [Seemüller et al. 1995; Orłowski und Wilk 2000]. Die äußeren Ringe des 20S Proteasoms werden von den Untereinheiten  $\alpha$ 1 bis  $\alpha$ 7 gebildet, die eine Interaktion mit Regulatormolekülen vermitteln (Abbildung 1).

Das 20S Proteasom bildet den katalytischen Kernkomplex des 26S-Proteasoms (Molekulargewicht über 2 Millionen Dalton). Am besten verstanden ist bisher die Wechselwirkung mit dem 19S Regulator, der primär ATP-abhängig polyubiquitinierten Proteine erkennt, entfaltet und sie der Proteolyse durch den Kernkomplex zugänglich macht [Coux et al.

1996; Rivett 1998; Kohler et al. 2001]. Der Substratumsatz durch das Proteasom kann weiterhin durch Bindung von speziellen Aktivatorkomplexen (PA28 und PA200) gesteigert werden. Durch Interaktion mit verschiedenen Molekülen können so genannte Hybridproteasomen entstehen, deren biologische Bedeutung jedoch noch nicht hinreichend geklärt ist.

**Abbildung 1.** Aufbau und Funktion des 26S Proteasomen als katalytischer Kernkomplex des Ubiquitin-Proteasomen-Systems



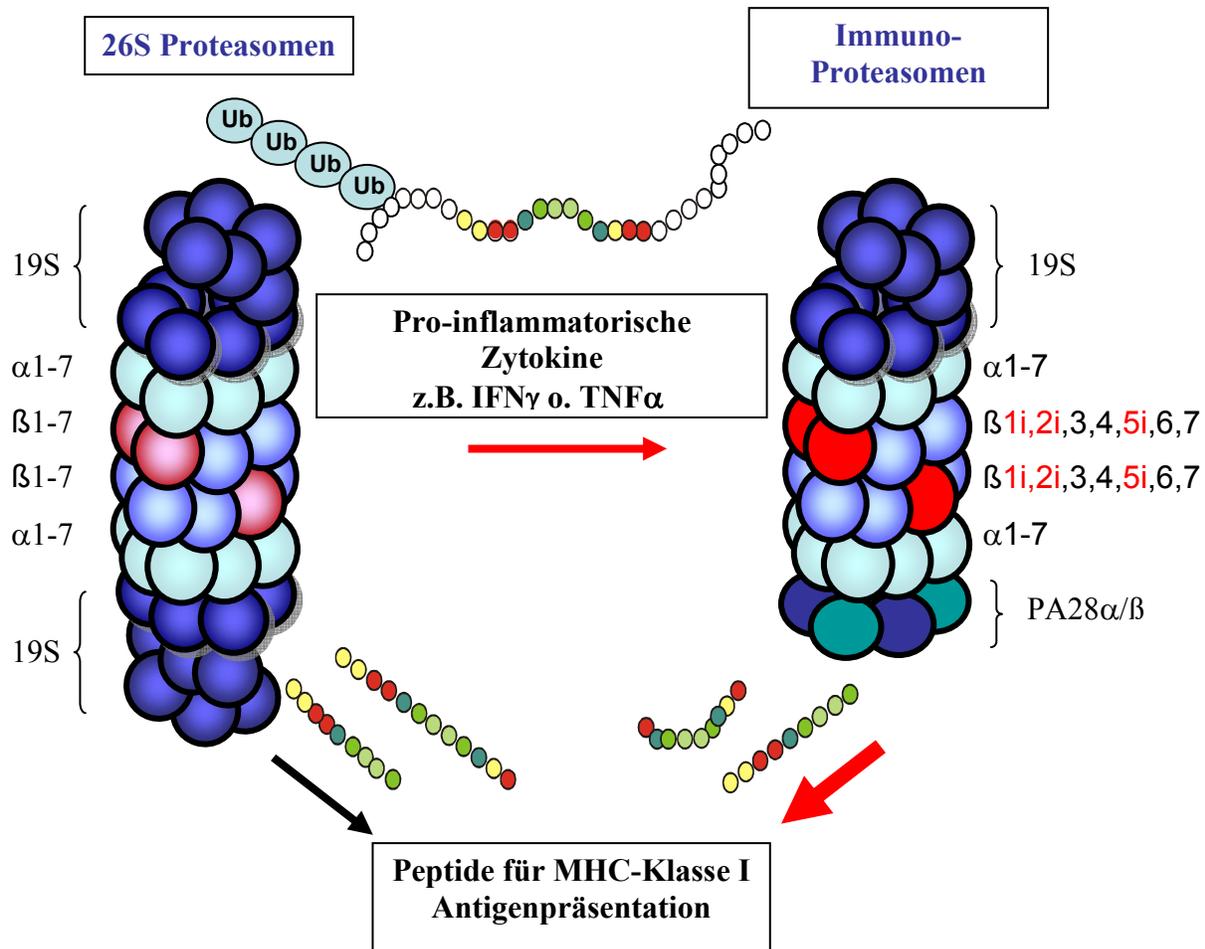
## 1.2 Immunsystem und Proteasomen

Das Ubiquitin-Proteasomensystem ist in die Regulation von Entzündungs- und Apoptosemechanismen u.a. durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B einbezogen. Durch verschiedene Mechanismen erfolgt zunächst eine Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen mit anschließender Phosphorylierung und Polyubiquitinylierung von NF $\kappa$ B-Inhibitionsfaktoren (I $\kappa$ B). Die folgende proteasomenabhängige Degradation von ubiquitinyliertem I $\kappa$ B führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B mit folgender nukleärer Translokation und DNA-Bindung der Untereinheiten p65, p105/p50, p100/p52, c-Rel sowie RelB. Diese Signalkaskade wird im Allgemeinen durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1, aber auch durch Lipopolysaccharide (LPS) initiiert. In B-Zellen vermitteln alternative Trigger wie BAFF und Lymphotoxin- $\beta$  eine NF $\kappa$ B-Signalaktivierung. Darüber hinaus kann eine NF $\kappa$ B-Aktivierung auch I $\kappa$ B-Kinasen unabhängig durch DNA-Schädigung erfolgen. Da die NF $\kappa$ B-Signalkaskade eine wichtige Rolle sowohl in der Auslösung der angeborenen und erworbenen Immunreaktion als auch für die Regulation des Zellzyklus spielt, ist seine Aktivierung durch das Ubiquitin-Proteasomensystem ein kritischer und zentraler Schritt [Schmitz et al. 2004].

Zunehmendes Interesse gewinnen die verschiedenen Zustandsformen des Proteasoms innerhalb der Evolution des Immunsystems. Dabei können interessanterweise durch strukturelle Modifikation auch die katalytischen Eigenschaften des Proteasoms beeinflusst werden. Am besten untersucht ist die Induktion von drei Proteasomenuntereinheiten (LMP2/ $\beta$ 1i, LMP7/ $\beta$ 5i und MECL1/ $\beta$ 2i) unter dem Einfluss von Interferon- $\gamma$  [Aki et al. 1994; Nandi et al. 1996; Früh und Yang 1999; Witt et al. 2000; Stoltze et al. 2000; Hallermalm et al. 2001]. Im gleichen Zusammenhang kommt es auch zur Induktion des Proteasomen Aktivators (PA28), von Peptidtransportern des endoplasmatischen Retikulums (TAP1/TAP2) und des Proteasomen-Maturierungsproteins (POMP). Durch den Austausch von konstitutiven Untereinheiten des 20S

Proteasoms gegen induzierbare Untereinheiten entsteht das so genannte Immunoproteasom mit verändertem Schnittverhalten und demzufolge Auswirkung auf Quantität und Qualität der prozessierten Antigene (Peptide) [Boes et al. 1994; Stohwasser 1996; Abbildung 2].

**Abbildung 2.** Struktur und Funktion des 26S Proteasomen werden durch pro-inflammatorische Prozesse beeinflusst



Eine weitere wichtige immunologische Funktion kommt dem Proteasomen in der Antigeneneration für den MHC Klasse-I Präsentationsweg zu. Die Antigenpräsentation erfolgt durch professionelle antigenpräsentierende Zellen über Bindung an MHC-Moleküle.

Unterschieden werden dabei grundsätzlich ein zytoplasmatischer (MHC Klasse-I) und ein lysosomaler (MHC Klasse-II) Prozessierungsweg. Das Proteasom repräsentiert den zentralen Proteasekomplex für die Herstellung von antigenen Peptiden für den MHC Klasse-I Präsentationsweg in allen kernhaltigen Zellen und ist in diesem Zusammenhang auch in die Prozessierung von viralen Antigenen einbezogen [Gromme und Neefjes 2002; Kloetzel und Ossendorp 2004; Rivett et al. 2004].

Die durch das proteasomale System generierten Peptide mit einer Länge von 8-13 Aminosäuren dienen sowohl als MHC Klasse-I Liganden als auch als deren Präkursoren. Zunächst werden diese bei entsprechender Bindungseignung über TAP1/TAP2 in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Präkursoren von MHC Klasse-I Liganden werden dann durch ER-Proteasen N-terminal prozessiert [Stoltze et al. 2000; Rock et al. 2004]. Nach Bindung an die individuellen MHC Klasse-I Moleküle kann schließlich eine Zelloberflächenpräsentation stattfinden, in deren Folge eine Interaktion mit T-Zellen und gegebenenfalls die Induktion einer zytotoxischen Immunantwort über CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten resultieren kann. Die über MHC Klasse-I auf dendritischen Zellen präsentierten Peptide sind am Priming von T- und B-Lymphozyten einerseits und der Erkennung von tolerierten Epitopen andererseits beteiligt [Jego et al. 2005; Santiago-Schwarz et al. 2004]. Dendritische Zellen können durch Makropinozytose internalisierte Antigene sowohl über MHC Klasse-I als auch -II Moleküle präsentieren, wobei offensichtlich in begrenztem Maße ein Austausch von Antigenen zwischen beiden Präsentationswegen stattfinden kann [Norbury 2006; Wilson und Villadangos 2005; Guermonprez und Amigorena 2005]. Bei dem Mechanismus der "cross-presentation" werden in dendritischen Zellen antigene Substrate von Donorzellen durch das Proteasom prozessiert und können zum „cross-priming“ von naiven CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten führen [Serna et al. 2003; Norbury et al. 2004].

Für die Generierung der antigenen Determinanten für MHC Klasse-II Moleküle ist der lysosomale Abbau verantwortlich. Dabei werden insbesondere phagozytierte Proteine prozessiert und nach Verschmelzung der Vesikel des Phagolysosoms mit Hilfe von HLA-DM auf MHC Klasse-II Moleküle transferiert und an die Zelloberfläche transportiert. Hier tragen sie in Wechselwirkung mit spezifischen Oberflächenrezeptoren zur Aktivierung von T-Helferzellen (CD4+) bei. Im Effekt führt dies zur Ausschüttung von Zytokinen, Aktivierung von B-Zellen und schließlich zur Antikörperproduktion.

Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass die antigenen Peptide für die MHC Klasse-I Präsentation überwiegend über den Abbau von zytoplasmatischen oder nukleären Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasomensystem generiert werden. Auf Grund des bekannten Zytokinprofils bei Kollagenosen kann außerdem eine Beeinflussung des Proteasomensystems durch die Induktion von Immunoproteasomen angenommen werden. Weiterführende experimentelle Analysen sind notwendig, um die Komplexität dieser bisher nicht vollständig untersuchten Beziehungen zu verstehen und gleichzeitig weitere Einblicke in die Entstehung autoimmuner Prozesse zu gewinnen.

### **1.3 Systemische Autoimmunerkrankungen**

Systemische Autoimmunerkrankungen sind klinisch potentiell schwerwiegende, zum Teil auf verschiedene Organsysteme übergreifende Krankheitsbilder. Der gestörten Immunregulation mit Einbeziehung der T- und B-Zellkompartimente liegen in der Regel eine genetische Prädisposition sowie eine Reihe von exogenen Triggern zugrunde [Mountz et al. 1994; Marrack et al. 2001]. Typisch sind deshalb chronisch-entzündliche Prozesse mit rezidivierenden Krankheitsschüben bei reduzierter Lebenserwartung, wie im Falle der Kollagenosen beim systemischen Lupus erythematoses, den autoimmunen Myositiden, dem primären Sjögren-Syndrom und der Sklerodermie. Gegenwärtig werden deshalb systemisch wirksame Immunsuppressiva mit unterschiedlichem Wirkspektrum standardmäßig eingesetzt.

Ein entscheidender Beitrag zur frühzeitigen Diagnose und zur weiteren Therapiekontrolle von systemischen Autoimmunerkrankungen konnte durch Untersuchungen zu den häufig assoziierten und teilweise hochspezifischen Autoimmunreaktionen geleistet werden. Dabei können die jeweiligen Krankheitsbilder durch verschiedene Effektormechanismen gekennzeichnet sein, wobei sowohl direkt zytotoxische Reaktionen, vermittelt durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellinfiltrate und B-Zell generierte Autoantikörper überwiegen können. Als Zielantigene wurden bisher Bestandteile des Zellkerns, zytosolische Proteine und Rezeptorproteine identifiziert und diagnostisch eingesetzt. Interessanter Weise spielen bei systemischen Autoimmunerkrankungen insbesondere evolutionär hochkonservierte und ubiquitäre Proteine bzw. Proteinnukleotid-Komplexe als Autoantigene eine entscheidende Rolle [Mühlen und Tan 1995].

## **1.4 Aktuelle Konzepte zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der B-Zellfunktion**

Die Entstehung und Ausprägung von Autoimmunerkrankungen wird durch genetische Veranlagung, Alter und Geschlecht sowie exogenen Faktoren wie Infektionen oder Noxen beeinflusst. Obwohl die jeweiligen Krankheitsbilder klinisch heterogen sind und sich durch das Spektrum der Organmanifestationen sowie spezifische serologische Marker unterscheiden, liegen der gestörten Immunreaktion allgemeine Pathomechanismen zugrunde. Die Wechselwirkung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort führt bei systemischen Autoimmunerkrankungen zu einem Verlust der Toleranz gegen körpereigene Antigene mit Entwicklung einer antigenspezifischen zellulären sowie humoralen Immunantwort und zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Chemokinen sowie Zytokinen, die Signale zur Gewebeeinfiltration vermitteln und Effektorzellen aktivieren.

Potentiell autoreaktive T-Zellen werden überwiegend im Thymus deletiert oder einer peripheren Kontrolle durch regulatorische T-Zellen und dendritische Zellen unterworfen, die eine Toleranz gegenüber Autoantigenen sichert. Diese Kontrollmechanismen können jedoch durchbrochen werden, zum Beispiel durch Toll-like Rezeptor (TLR) Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) und einer daraus folgender Suppression von regulatorischen T-Zellen [Pasare und Medzhitov 2003]. Schließlich können pathogen-spezifische T-Zellen durch Wechselwirkung mit professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC) in ihrer Spezifität und Differenzierung beeinflusst werden, so dass direkt zytotoxische Effektorfunktionen oder aber Helferfunktionen für naive B-Zellen zur Produktion von (Auto-) Antikörpern vermittelt werden.

Die negative Selektion von potentiell autoreaktiven B-Zellen findet über mehrere transiente Entwicklungsstadien statt, die von einem naiven B-Zellkompartiment im Knochenmark ausgeht

und unter anderem vom individuellen B-Zellrezeptor-Repertoire und der Antigenexposition abhängt [Grimaldi et al. 2005]. Die Regulation der B-Zelltoleranz wird zusätzlich von der genetischen Veranlagung sowie von Signalen der angeborenen Immunität wie den TLR-Signalen beeinflusst [Kumar et al 2006; Silver et al. 2006]. Die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper produzierende Plasmablasten und Plasmazellen erfolgt primär durch Interaktion mit CD4+ T-Helferzellen. Dendritische Zellen sezernieren Typ-I Interferone und „B-cell activating factor“ (BAFF) und beeinflussen damit die B-Zellaktivierung und -differenzierung [Brummel et al. 2006, Pascual et al. 2003, Vallin et al. 1999]. Die komplexe Einbeziehung von diversen B-Zellpopulationen in Autoimmunprozesse schließt darüber hinaus ihre antigenpräsentierenden Eigenschaften sowie ihre Interaktion mit APC und T-Zellen ein [Viau und Zouali 2005; Roth et al. 1997, Chan und Shlomchik 1998].

Autoreaktive B-Zellen üben somit ihre Effektorfunktion über verschiedene Pathomechanismen aus, wobei die Produktion von antigenspezifischen Autoantikörpern eine zentrale Rolle spielt. Autoreaktive Plasmazellen können dabei zum Teil langlebig und resistent gegen eine immunsuppressive Therapie sein [Hiepe und Dörner 2005]. Eine Antikörperbindung an das Zielantigen kann direkt zu einer Beeinflussung der zellulären Funktion führen, wobei sowohl agonistische als auch neutralisierende Effekte auftreten können. Bei Expression des Zielantigens auf der Zelloberfläche können Autoantikörper direkt depletierend wirken oder durch Aktivierung des Komplementsystems eine Zellyse verursachen. In der Pathogenese von systemischen Autoimmunerkrankungen kommt insbesondere der Bildung von Immunkomplexen aus Autoantikörpern und zirkulierendem Autoantigen eine wichtige Bedeutung zu. Dabei kommt es nach Ablagerung von Immunkomplexen im Gewebe zu einer Aktivierung des Komplementsystems sowie der zellulären Immunantwort, vermittelt durch Fc-Rezeptoren auf myeloiden und lymphoiden Zellen [Martin und Chan 2006].

Der direkte Nachweis einer pathogenetischen Bedeutung konnte bisher nicht für alle Autoantikörper erbracht werden. Unabhängig davon haben sie jedoch ihren Stellenwert als diagnostische Marker. Autoantikörper können in diesem Zusammenhang eine hohe Krankheitsspezifität aufweisen und eng mit einer Organbeteiligung assoziiert sein. Zum Teil gelingt der Nachweis von Autoantikörpern bereits mehrere Jahre vor Auftreten der eigentlichen Krankheitsmanifestation. Als Aktivitäts- und Prognosemarker können sie darüber hinaus wichtige Informationen für therapeutische Entscheidungen liefern.

Weitestgehend unklar sind bisher die Pathomechanismen, die zur Entstehung von spezifischen Autoimmunreaktionen führen; dies schließt ebenfalls die Mechanismen der Antigengeneration und -präsentation über MHC Klasse-I oder -II ein. In diesem Zusammenhang sind Kollagenosen wie die autoimmune Myositis von besonderem Interesse, da hier beide Präsentationswege beteiligt sind. Bei der Polymyositis prädominieren im betroffenen Muskelgewebe insbesondere aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellinfiltrate, die auf einen MHC Klasse-I-vermittelten antigenspezifischen Pathomechanismus hinweisen [O'Hanlon et al. 1995]. Im Gegensatz dazu ist die Dermatomyositis durch CD4<sup>+</sup> T-Zellinfiltrate und Plasmazellen in Umgebung der Haut- und Muskelgefäße charakterisiert [Targoff 1994]. Hier wird ein humorales Antigen vermutet, das zu einer komplementvermittelten Vaskulitis führt [Dalakas 1991]. Interessanter Weise lassen sich spezifische Autoantikörper bei beiden Krankheitsgruppen in nur relativ niedriger Prävalenz von etwa 20% nachweisen. Am häufigsten sind Autoantikörper gegen Aminoacyl-tRNA Synthetasen gerichtet, die die Bindung zwischen tRNA und ihrer jeweiligen Aminosäure im Zytoplasma katalysieren [Matthews und Bernstein 1983]. Diese Autoantikörper charakterisieren ein klinisches Überlappungssyndrom, das so genannte Anti-Synthetase-Syndrom, das neben einer Myositis auch andere Organmanifestationen (Lungenbeteiligung, Gelenkbeteiligung, Vaskulitis)

aufweist. Die Mehrzahl der Patienten mit autoimmuner Myositis konnten jedoch bisher serologisch nicht erfasst werden, so dass die Diagnosesicherung meist nur durch typische Klinik, Histologie und entzündliche Parameter möglich war. In den von uns durchgeführten Untersuchungen wurde diese Lücke durch die Identifizierung des Proteasoms, als ein neues relevantes Antigen bei Kollagenosen, insbesondere bei der Dermato- und Polymyositis, zum überwiegenden Teil geschlossen [Feist et al. 1996].

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Erkenntnisse zur Bedeutung des Ubiquitin-Proteasomensystems in der Regulation von Entzündungsprozessen sowie auch in der Generation von antigenen Peptiden für den MHC Klasse-I Präsentationsweg sind von besonderem Interesse für die Pathogenese systemischer Autoimmunerkrankungen.

In einer früheren Arbeit waren Autoantikörper gegen Proteasom bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes beschrieben worden [Arribas et al. 1991]. Allerdings waren keine ausreichenden Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität dieser Immunreaktion erfolgt, und die eigentlichen Zielantigene innerhalb des Proteasomenkomplexes wurden nicht identifiziert. Einen weiteren bekannten Autoantikörper mit Bezug zum Proteasomensystem stellen Anti-Ki Antikörper dar. Diese Antikörper gelten als diagnostische Marker bei systemischem Lupus erythematodes, wobei als Zielantigen eine Untereinheit des Proteasomenaktivators (PA28- $\gamma$ ) beziehungsweise ein Homolog des PA28 charakterisiert werden konnte [Wilk et al. 2000].

Bislang unklar war jedoch, ob Antikörper gegen Bestandteile des Proteasomen-Komplexes signifikant zum Autoantikörper-Profil bei systemischen Autoimmunerkrankungen beitragen. Deshalb war es ein Ziel der Arbeit, standardisierte Nachweismethoden für Anti-Proteasomen-Antikörper zu entwickeln, um deren diagnostischen und möglicherweise pathogenetischen Stellenwert zu klären. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, ob Anti-Proteasomen-Antikörper mit bereits etablierten Screening-Verfahren wie z.B. dem Nachweis von Anti-nukleären Antikörpern detektiert werden können bzw. mit bereits bekannten Auto-Antikörpermustern in solchen Screeningtests überlappen.

Ausgehend von der näheren Charakterisierung der Anti-Proteasomen Reaktivität war es darüber hinaus von Interesse, ob es zu einer Beeinflussung der Proteasomenaktivität durch Anti-Proteasomen-Antikörper kommt. Insbesondere stellte sich die Frage, ob Anti-Proteasomen-Antikörper in der Lage sind, die proteolytische Aktivität des Proteasomenkomplexes direkt oder indirekt zu beeinflussen. Für andere bekannte Autoantikörper-Autoantigen-Systeme war eine solche Wechselwirkung bereits beschrieben, wie z.B. für Anti-Synthetase Antikörper bei autoimmuner Myositis, die die proteolytische Aktivität der tRNA-Synthetasen inhibieren können. Ein weiteres Beispiel stellen Anti-Ribosomen Antikörper dar, die *in vitro* die Bindung von Elongationsfaktoren am Ribosomen blockieren können. In diesem Zusammenhang war es somit von Interesse, ob die proteolytische Aktivität des 20S Proteasomen durch Anti-Proteasomen-Antikörper direkt oder indirekt, zum Beispiel durch Wechselwirkung mit physiologischen Aktivatoren oder Regulatoren des Proteasomen-Komplexes, beeinflusst wird.

Da das 20S Proteasom wesentlich zum Gesamtpool der intrazellulären Proteine beiträgt, war es in einem weiteren Teil des Projektes von Interesse, ob und in welcher Form eine Freisetzung von 20S Proteasomen bei entzündlichen Prozessen in die Zirkulation stattfindet. Dabei könnte durch eine Freisetzung von Proteasomen in Analogie zu anderen bekannten Autoantigenen die immunologische Toleranz gegen das Autoantigen durchbrochen werden, was zur Bildung einer humoralen Immunreaktion beitragen könnte. Deshalb sollte ein Assay zum Nachweis von zirkulierenden 20S Proteasomen in biologischen Proben entwickelt werden.

Für die oben beschriebenen Vorhaben war es zum Teil erforderlich, Anti-Proteasomen-Antikörper in gereinigter Form zu verwenden, um unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Autoantikörpern wie z.B. Rheumafaktoren auszuschließen. Mittels einer affinitätsgereinigten Anti-Proteasomen-Antikörperfraktion wäre darüber hinaus auch der eindeutige Nachweis der

Existenz dieser Antikörper erbracht und eine weitere nähere Charakterisierung dieser Autoimmunreaktion möglich.

Schließlich war es Ziel der Arbeit, erstmalig die Expression und Funktion des Proteasoms bei systemischen Autoimmunerkrankungen sowie auch seine Rolle in deren Pathogenese zu untersuchen. Insbesondere unter dem Aspekt einer Induktion der Immunoproteasomen-Untereinheiten war es von Interesse zu untersuchen, ob eine Veränderung oder Deregulation innerhalb des Proteasomen-Systems bei Autoimmunerkrankungen auftritt. Dies könnte ebenfalls Auswirkungen auf Entzündungs- und Immunregulation sowie auch auf apoptotische Prozesse haben.

## **2. Charakteristika der untersuchten Patienten und Kontrollen**

In die Untersuchungen wurden Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen aus dem Formenkreis der Kollagenosen und Vaskulitiden sowie mit primär entzündlich-rheumatischen Gelenkserkrankungen eingeschlossen. Dabei war es zunächst erforderlich, ein relativ breites Spektrum der verfügbaren Autoimmunerkrankungen in einem gut charakterisierten Patientenkollektiv zu untersuchen, um Spezifität und Sensitivität der Immunreaktion gegen das Proteasomen zu klären. Als Kontrollen dienten Patienten mit Tumorerkrankungen und gesunde Personen. Für die Untersuchung von zirkulierenden Proteasomen als Marker für Zellzerfall und Immunaktivierung wurden neben Autoimmunerkrankungen auch Verlaufsuntersuchungen bei Patienten nach chirurgischen Eingriffen einbezogen. Die Referenzwerte für pathologisch erhöhte Anti-Proteasomen-Antikörper bzw. zirkulierende Proteasomen wurden aus Serum und Plasmaproben von gesunden Spendern bestimmt.

Für die Isolation von Anti-Proteasomen-Antikörpern wurden Seren von gut charakterisierten Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung und stark positiven Anti-Proteasomen-Antikörpern verwendet. Alle im Rahmen der Arbeit eingesetzten Proben von Patienten kommen aus der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité- Universitätsmedizin Berlin, oder wurden in Zusammenarbeit mit anderen Kliniken der Charité zur Verfügung gestellt. Die durchgeführten Untersuchungen wurden überwiegend aus Rückstellproben der serologischen Routinediagnostik des Autoimmunlabors der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie nach positivem Votum der Ethikkommission durchgeführt. Detaillierte Angaben zur Epidemiologie, klinischen und serologischen Charakterisierung der jeweiligen Patienten und Kontrollgruppen finden sich in den angefügten Publikationen.

### **3. Angewandte Methoden zur Untersuchung des Proteasomensystems**

#### **3.1 Proteasomenaufreinigung und Proteaseassay**

Die Isolation von 20S Proteasomen erfolgte standardgemäß aus humanen Erythrozyten [Kuckelkorn et al. 2000]. Eine anschließende Überprüfung der Präparation wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und zur Analyse einzelner Proteasomenuntereinheiten mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese vorgenommen (Isoelektrische Fokussierung mit anschließender SDS-Gelelektrophorese). Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität der präparierten 20S Proteasomen geschah mittels eines in vitro Protease-Assays unter Nutzung von fluorogenen Peptiden als Substrate. Der Proteasomenaktivator PA28 wurde ebenfalls aus humanen Erythrozyten gewonnen, dazu wurden Erythrozyten osmotisch lysiert und an DEAE-Sephacel (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gebunden. Anschließend wurde PA28 gemeinsam mit 20S Proteasomen mit 500 mM NaCl TEAD eluiert, mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (40%-70% Sättigung) konzentriert und gegen TEAD dialysiert. Die Proteine wurden an eine Anionenaustausch-Säule TSK-Gel (DEAE-Toyopearl 650S) gebunden und mittels eines Gradienten von 50-350 mM NaCl in TEAD eluiert. Dabei wurde PA28 vor 20S Proteasomen eluiert. Die konzentrierte PA28 Fraktion wurde mittels Dichtegradient-Zentrifugation in einem Glycerolgradienten von 10-40% aufgetrennt (16 Stunden bei 40.000 Rotationen/min, SW40 Rotor, Beckman&Coulter, Fullerton, USA). Anschließend wurde PA28 an eine MonoQ-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gebunden und mittels 100-250 mM NaCl in TEAD eluiert. Abschließend wurde PA28 mittels Phenylsepharose High Performance (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgetrennt.

Um die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen 20S Proteasom und PA28 zu untersuchen, erfolgte die Zugabe von ansteigenden Konzentrationen von affinitätsgereinigten Anti-Proteasomen-Antikörpern. Die Freisetzung der fluorogenen Reportergruppe AMC aus dem

Peptidsubstrat (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin mit einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$ ) durch das Proteasom wurde nach einer Inkubationszeit von 30-90 min bei 460 nm gemessen (Excitation 360nm).

### **3.2 Immunoassays zum Nachweis von Anti-Proteasomen-Antikörpern**

Zum Nachweis von Anti-Proteasomen-Antikörpern kamen verschiedene selbst entwickelte ELISAs zum Einsatz. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 20S Proteasom (1  $\mu\text{g/ml}$ ) in Carbonatpuffer pH 9,6 über Nacht beschichtet. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen erfolgte die Inkubation eines humanen Serums in der Verdünnung 1:100 über 2 Std. bei Raumtemperatur. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-human-IgG POD markiertes Konjugat. Gebundene Antikörper wurden enzymatisch mittels O-Phenylendiamin als Substrat photometrisch bei 492 nm gemessen. Zur Etablierung einer Standardkurve zum Abgleichung verschiedener ELISA wurde initial ein polyklonaler Proteasomen-spezifischer Antikörper (MP3) und in weiteren Assays ein Anti-Proteasomen-Antikörper positives Patientenserum verwendet. Zur Bestätigung der Spezifität der gemessenen Anti-Proteasomen Reaktivität wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt, bei dem im ersten Schritt ein monoklonaler Anti-Proteasomen-Antikörper (B65-BA5) in einer Verdünnung von 1:1000 an die Mikrotiterplatte gebunden wurde. Gereinigte Proteasomen wurden dann in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  hinzu gegeben. Anschließend wurden humane Serenproben in einer Verdünnung von 1:100 über 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein Schaf Anti-human IgG (monospezifischer Antikörper) POD markiert (affinitäts-isolierte Antikörper ohne Kreuzreaktivität gegen Maus oder Ratten IgG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 1:10.000 inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mittels 2-amino-bis-ethylbenzthiazolin-6-sulfat-diammonium als Substrat bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Für Immunoblot-Analysen wurde ein 15%-iges SDS-Gel zur Separation der Proteasomenuntereinheiten verwendet. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran. Nach Blockierung der Nitrocellulose mit 5% Trockenmilch/PBS erfolgte die Inkubation der Patientenserum in einer Konzentration von 1:100. Gebundene Anti-Proteasomen-Antikörper wurden mittels Kaninchen Anti-human IgG Antikörper (POD markiert) in einer Verdünnung von 1:10.000 nachgewiesen. Enhanced Chemilumineszenz (ECL) wurde zur Visualisierung der Antikörperreaktion eingesetzt. Zur 2-dimensionalen Auftrennung von 20S Proteasomen erfolgte vor SDS-Gelelektrophorese eine isoelektrische Fokussierung, womit sich die verschiedenen Proteasomenuntereinheiten entsprechend ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte differenzieren lassen.

Zur Darstellung von Anti-Proteasomen-Antikörper in der Immunfluoreszenz wurden affinitätsgereinigte Anti-Proteasomen-Antikörper verwendet. Das Immunfluoreszenzmuster wurde auf verschiedenen humanen Zelllinien (HEp-2, Saos-2 und Hela) untersucht. Fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den gereinigten Anti-Proteasomen-Antikörpern in einer Konzentration von 50 µg/µl für 60 min inkubiert. Als Sekundär-Antikörper diente ein Kaninchen Anti-human IgG-Fc FITC markiertes Konjugat in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:500.

### **3.3 Isolierung und Charakterisierung von Anti-Proteasomen-Antikörpern**

Die Isolierung von Anti-Proteasomen-Antikörpern erfolgte aus Serum- und Plasmaproben in drei Schritten. Im ersten Schritt erfolgte eine Isolation der Globulinfraktion durch Ammoniumsulfatfällung (40% Sättigung), im zweiten Schritt eine Isolierung der Immunglobulin G-Fraktion über Absorption an Protein G-Sepharose (Amersham) und im dritten Schritt die affinitätschromatographische Reinigung von Anti-Proteasomen-Antikörpern über 20S

Proteasom-Sepharose. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Anti-Proteasomen-Antikörper wurde anschließend mittels Immunoassays (ELISA, Immunoblotting) überprüft. Die Zielantigene der Antikörper wurden mittels 2-D Auftrennung (SDS-Gelelektrophorese und IIF) der proteasomalen Untereinheiten charakterisiert.

### **3.4 Nachweis und Charakterisierung von 20S Proteasomen im Serum und Plasma**

Zum Nachweis von zirkulierenden 20S Proteasomen in Serum- und Plasmaproben wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt. Dazu wurde eine ELISA-Mikrotiterplatte mit dem polyklonalem Anti-Proteasomen-Antikörper K42 1:1000 in Carbonatpuffer pH 9,6 über Nacht beschichtet. Humane Serum- und Plasmaproben wurden in der Verdünnung 1:10 für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung der Proteasomen Konzentration wurde eine Standardkurve mit humanen gereinigten Proteasomen in einer Konzentration von 1000 ng/ml bis zu 12,5 ng/ml in sechs linearen Verdünnungsstufen eingesetzt. Ein biotinmarkierter monoklonaler Anti-Proteasomen-Antikörper (HP 903, 10 µg/ml) wurde zur Detektion von gebundenen Proteasomen in einer Verdünnung von 1:1000 über 1 Std. bei Raumtemperatur eingesetzt. Gebundene biotinmarkierte Antikörper wurden enzymatisch mittels Streptavidin gekoppeltem POD (Verdünnung 1:2000, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) mit Tetramethylbenzidin als Substrat an einem Mikroplatten-Reader bei 450 nm nach einer Inkubationszeit von 30 min gemessen. Zur Bestimmung des Referenzwertes für eine pathologisch erhöhte Proteasomen-Konzentration wurden 85 gesunde Kontrollen verwendet, von denen Mittelwert + 2,5-fache Standardabweichung als Referenzbereich definiert wurden. Zum Ausschluss einer unspezifischen Reaktion des Testes wurden verschiedene Kontrollproteine eingesetzt, die kein messbares Signal ergaben.

Zur Charakterisierung von zirkulierenden 20S Proteasomen erfolgte eine Anreicherung aus humanen Serumproben sowie aus Erythrozyten mittels Ionenaustausch-Chromatographie DEAE-Sephacel (Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Germany) sowie durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung in einer Sättigung von 40-65%. Nach Ultrazentrifugation in einem 10-40%-igem Saccharosegradienten für 16 Std. bei 40.000 Rotationen/min wurden Fraktionen in 0,6 ml Aliquots gesammelt. Der Nachweis von Proteasomen in den Dichtegradientenfraktionen erfolgte mittels Immunoblot und Protease-Assay unter Verwendung von fluorogenen Peptiden als Substrat (Z-GGL-MCA, Bz-VGR-MCA und Z-LLE- $\beta$ NA). Verschiedene Proteasomen spezifische polyklonale und monoklonale Antikörper wurden zum Nachweis von Proteasomen Untereinheiten im Westernblot verwendet.

### **3.5. Expression von Proteasomen auf mRNA und Proteinebene**

Expressionsanalysen zum Proteasomensystem wurden auf mRNA-Ebene mittels real time PCR-Technik durchgeführt. Dazu wurden periphere Blut- mononukleäre Zellen (PBMC) aufgereinigt und die gesamt RNA extrahiert. Darüber hinaus erfolgte bei Patienten mit Sjögren-Syndrom ebenfalls eine RNA-Präparation aus Gewebeproben von Lippendrüsen-Biopsien. Untersucht wurde die Expression der Immunoproteasomen-Untereinheiten LMP2 ( $\beta$ 1i), LMP7 ( $\beta$ 5i) sowie MECL1 ( $\beta$ 2i), der konstitutiven Proteasomenuntereinheiten C3 ( $\alpha$ 2) sowie C9 ( $\alpha$ 3) und der Untereinheiten des Proteasomenaktivators PA28- $\alpha$  sowie PA28- $\beta$ . Als Referenz-Gen wurde das Haushalts-Gen HPRT für PBMC verwendet. Bei Patienten mit Sjögren-Syndrom wurde außerdem  $\beta$ -Aktin als Referenz-Gen verwendet. GAPDH wurde als Referenz-Gen für Lippendrüsen-Biopsien eingesetzt.

Um einer gewebs- und krankheitsspezifischen Expression von Proteasomenuntereinheiten nachzugehen, erfolgte bei Patienten mit Sjögren-Syndrom die Expressions-Analyse der Proteasomenuntereinheiten C9 ( $\alpha 3$ ) und LMP7 ( $\beta 5i$ ) im Vergleich zur Expression des Zytokins IL1- $\beta$ , des Induzierbaren Costimulators (ICOS) sowie der Chemokin-Rezeptorliganden CCL1, CCL3 und CXCL7.

Die Unterschiede in der Expression auf mRNA-Ebene zwischen den Patientengruppen wurden mittels der Delta-CT Methode bestimmt. Der Expressionsunterschied zwischen dem Ziel-Gen und dem Referenz-Gen wurde berechnet unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Primereffizienzen.

Zum Nachweis der Expression von Proteasomenuntereinheiten auf Protein-Ebene erfolgte eine Analyse mittels Westernblot-Technik. Dazu wurde PBMC lysiert und die Proteinfraction standardisiert über 15% SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden entsprechende Anti-Proteasomen-Antikörper im Immunoblot eingesetzt. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ nach ECL mittels Densitometrie und Semiquantifikation mit der NIH Image 1.61 Software. Die relative Protein-Expression wurde in Bezug auf die Proteasomenuntereinheit C3 ( $\alpha 2$ ) bestimmt.

Im Gewebe von Lippendrüsen-Biopsie erfolgte eine immunhistologische Untersuchung der Expression der Proteasomenuntereinheit LMP7 mit einem polyklonalen Anti-LMP7 Kaninchenantikörper in einer Verdünnung von 1:1000.

### **3.6. Statistische Methoden**

Um die qualitativen und quantitative Unterschiede der Anti-Proteasomen-Antikörperreaktionen innerhalb der untersuchten Patientengruppen zu vergleichen, wurden der non-parametrische U-Test (Mann-Whitney) und der Kruskal-Wallis Test sowie der Chi-Square-Test mit Yates Korrektur angewandt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant anerkannt.

Die Auswertung der Ergebnisse der zirkulierenden Proteasomenbestimmungen erfolgte mittels der Prozedur SAS-MEANS, zum Vergleich der Mittelwerte wurden der t-Test oder Welch-Test (SAS t-Test Prozedur) in Abhängigkeit von gleichen oder ungleichen Variabilitäten eingesetzt.

Die Auswertung der Daten zur Gen-Expression erfolgte mittels der Software REST. Zur Analyse der Protein-Expression erfolgte der Student's t-Test oder Mann-Whitney U-Test) in Abhängigkeit von gleichen oder ungleichen Variabilitäten. Die Auswertung der mRNA-Expressionsergebnisse der Lippenrücken-Biopsien sowie PBMC bei Sjögren-Syndrom erfolgte mittels SAS t-Test Prozedur (SAS-System Version 9.1.3).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Diversität der humoralen Immunantwort gegen 20S Proteasomen bei Autoimmunerkrankungen

*Publikationen:*

*Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidtke G, Micheel B, Hiepe F, Burmester GR and Kloetzel PM. Proteasome  $\alpha$ -type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. J Exp Med 1996; 184:1313-1318.*

*Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM and Burmester GR. Autoantibodies in Primary Sjögren's Syndrome are Directed against Proteasomal Subunits of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Type. Arthritis and Rheumatism 1999; 42:697-702.*

*Kordonouri O, Meyer K, Egerer K, Hartmann R, Scheffler S, Burmester GR, Kuckelkorn U, Danne T, Feist E. Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. J Pediatr Endocrinol Metab 2004; 17:975-81.*

**Zusammenfassung:** Autoantikörper gegen Proteasomen treten in einer bemerkenswerten Diversität bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen auf. Die Prävalenz ist insbesondere hoch bei Kollagenosen, wie autoimmuner Myositis, systemischem Lupus erythematoses und primärem Sjögren Syndrom. In Bezug auf die autoimmune Myositis sind diese Antikörper bei Dermato- und Polymyositis in einer Frequenz von bis zu 62% der Fälle nachweisbar. Somit sind Anti-Proteasomen-Antikörper der häufigste bekannte Autoantikörper bei autoimmuner Myositis. Bei systemischem Lupus erythematoses waren bei 58% der Fälle Anti-Proteasomen-Antikörper nachweisbar. Die Untereinheit C9 ( $\alpha$ 3) des 20S Proteasomen konnte bei

beiden Krankheitsbildern als das predominante Zielantigen der Immunreaktion identifiziert werden.

Bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom konnte bei 39% der Fälle eine Antikörperreaktion gegen Proteasomen nachgewiesen werden. Charakteristisch war dabei eine Antikörper-Reaktivität gegen verschiedene Proteasomenuntereinheiten des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typs inklusive der proteolytisch aktiven Untereinheiten. Somit konnte bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom relativ häufig eine polyspezifische Immunreaktion gegen unterschiedliche Proteasomenuntereinheiten festgestellt werden.

Bei Patienten mit Mischkollagenose und rheumatoider Arthritis fand sich eine deutlich niedrigere Prävalenz von Anti-Proteasomen-Antikörpern. Patienten mit Tumorerkrankung und gesunde Kontrollen wiesen keine Reaktivität gegen Untereinheiten des 20S Proteasomen auf. Bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus fand sich eine Prävalenz von Anti-Proteasomen-Antikörpern von 21,9 %. Bemerkenswerter Weise waren 20% der Patienten auch positiv für antinukleäre Antikörper (ANA).

Zusammenfassend ergibt sich somit eine hohe Prävalenz von Anti-Proteasomen-Antikörper insbesondere bei autoimmuner Myositis und systemischem Lupus erythematodes. Der diagnostische Stellenwert ist jedoch aufgrund einer relativ niedrigen Spezifität dieser Autoantikörper eingeschränkt. Auffällig ist eine predominante Immunreaktion gegen die Untereinheit C9 ( $\alpha$ 3) bei autoimmuner Myositis und systemischem Lupus erythematodes. Im Gegensatz dazu tritt bei primärem Sjögren-Syndrom eine polyspezifische Immunreaktion gegen

verschiedene Untereinheiten des 20S Proteasom auf mit Einbeziehung von proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten.

Aufgrund der hohen Prävalenz von Anti-Proteasomen-Antikörpern bei Patienten mit Kollagenosen ergab sich die Notwendigkeit zu einer weiterführenden Untersuchung dieses Autoimmun-Phänomens. Dabei sollte insbesondere abgeklärt werden, ob Anti-Proteasomen-Antikörper mit anderen Autoantikörpern koinzident auftreten und möglicherweise in Antikörper-Screening-Tests erfasst werden können. In diesem Zusammenhang war auch von Bedeutung, ob Anti-Proteasomen-Antikörper zu den antinukleären Antikörpern gehören und mit bekannten anderen Autoantikörpern im Fluoreszenzmuster, die diagnostisch genutzt werden, interferieren. Darüber hinaus stellt sich die Frage nach einer Korrelation zwischen Anti-Proteasomen-Antikörpern und Krankheitsmanifestation und -verlauf.

*Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidke G, Micheel B, Hiepe F, Burmester GR and Kloetzel PM. Proteasome  $\alpha$ -type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. J Exp Med 1996; 184:1313-1318.*

*Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM and Burmester GR. Autoantibodies in Primary Sjögren's Syndrome are Directed against Proteasomal Subunits of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Type. Arthritis and Rheumatism 1999; 42:697-702.*

*Kordonouri O, Meyer K, Egerer K, Hartmann R, Scheffler S, Burmester GR, Kuckelkorn U, Danne T, Feist E. Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. J Pediatr Endocrinol Metab 2004; 17:975-81.*

## 4.2 Antikörper gegen 20S Proteasomen gehören zu den Anti-nukleären Antikörpern

*Publikation:*

*Feist E, Brychcy M, Hausdorf G, Hoyer B, Egerer K, Dorner T, Kuckelkorn U, Burmester GR. Anti-Proteasome autoantibodies contribute to ANA- patterns on HEp-2 cells. Ann Rheum Dis. 2007;66:5-11*

**Zusammenfassung:** Antikörper gegen 20S Proteasomen waren in einer hohen Prävalenz insbesondere bei Patienten mit Kollagenosen nachweisbar. Zur weiterführenden Charakterisierung dieser Antikörper wurde eine Affinitätsreinigung durchgeführt, um mögliche Kreuzreaktionen von anderen Autoantikörpern auszuschließen und somit den Beweis für die Spezifität dieser Autoantikörper zu erbringen. Bei Kollagenosen gelten antinukleäre Antikörper als wichtiger diagnostischer Marker und werden mittels serologischer Screening-Verfahren in der Immunfluoreszenz auf HEp-2 Zellen nachgewiesen. Um zu klären, ob Anti-Proteasomen-Antikörper ebenfalls zu den antinukleären Antikörpern gehören und um eine Interferenz mit anderen antinukleären Antikörpern auszuschließen, war eine Aufreinigung dieser Antikörper erforderlich.

Anti-Proteasomen-Antikörpern wurden aus Serum- und Plasmaproben von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen affinitätschromatographisch aufgereinigt und in der Immunfluoreszenz sowie in weiteren Immunoassays zur Bestätigung der Spezifität eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Anti-Proteasomen-Antikörper signifikant zum ANA-Muster bei Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen beitragen. Das Anti-Proteasomen-Muster war charakterisiert durch eine granuläre Zellkernfluoreszenz mit zusätzlicher feingranulärer Färbung des Zytoplasmas insbesondere im Bereich des endoplasmatischen Retikulums und perinukleär. Zum Teil war eine Überlappung mit anderen bekannten

zytoplasmatischen Fluoreszenzmustern, wie z.B. von Antikörpern gegen Mitochondrien, zu beobachten. In nachfolgenden Untersuchungen wurde die Spezifität von Anti-Proteasomen-Antikörpern durch Gegenfärbung mit mono- und polyklonalen Referenz-Antikörpern bestätigt. Darüber hinaus konnte eine Ko-lokalisierung mit monoklonalen Referenz-Antikörpern gegen 20S Proteasomen mittels konfokaler Mikroskopie bestätigt werden.

Schlussfolgernd ergibt sich somit, dass Anti-Proteasomen-Antikörper auch zu den antinukleären Antikörpern gehören und somit einen diagnostisch relevanten Befund bei Patienten mit Kollagenosen darstellen. Der Nachweis von Anti-Proteasomen-Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz ist im ANA-Screening möglich. Da das Fluoreszenzmuster jedoch mit anderen Autoantikörpermustern überlappt, kann es als nicht-spezifisch eingeordnet werden. Somit müssen weiterführende Bestätigungstests mittels ELISA und Immunoblot durchgeführt werden, um Anti-Proteasomen-Antikörper eindeutig von anderen Autoantikörpern in der Immundiagnostik abzugrenzen. Anti-Proteasomen-Antikörper sollten in der ANA-Diagnostik berücksichtigt werden, weil sie mit anderen bekannten Antikörpermustern interferieren und somit zu diagnostischen Fehlinterpretationen führen können.

*Feist E, Brychcy M, Hausdorf G, Hoyer B, Egerer K, Dorner T, Kuckelkorn U, Burmester GR. Anti-Proteasome autoantibodies contribute to ANA- patterns on HEp-2 cells. Ann Rheum Dis. 2007;66:5-11*

### 4.3 Inhibition der Proteasomenaktivität durch Anti-Proteasomen-Antikörper

*Publikation:*

*Brychcy M, Kuckelkorn U, Hausdorf G, Egerer K, Kloetzel PM, Burmester GR, Feist E. Anti-20S proteasome autoantibodies inhibit proteasome stimulation by proteasome activator PA28. Arthritis Rheum. 2006;54:2175-83. Erratum in: Arthritis Rheum. 2006;54:2702.*

**Zusammenfassung:** Das 20S Proteasom ist eine multikatalytische Protease mit essenziellen Funktionen in der Regulation der Zellhomöostase sowie von Stress- und Entzündungsreaktionen. Darüber hinaus ist es in die Herstellung der Mehrzahl der antigenen Peptide für den MHC Klasse I Präsentationsweg involviert. Das 20S Proteasom interagiert in vivo mit Regulator- bzw. Aktivatorkomplexen, wodurch die Substrate der Proteolyse zugänglich gemacht werden. Unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  wird die Aktivität des Proteasomen bezüglich Qualität und Quantität der hergestellten Schnittprodukte nachhaltig modifiziert.

Mit der erfolgreichen Isolation von Anti-Proteasomen-Antikörpern stellte sich nunmehr die Frage, ob diese Antikörper die Aktivität des Proteasomenkomplexes beeinflussen können. Dazu wurde die proteolytische Aktivität von 20S Proteasomen unter Stimulation mit PA28 mit und ohne Zugabe von humanen affinitätsgereinigten Anti-Proteasomen-Antikörpern sowie weiteren Kontroll-Antikörpern untersucht.

Im Ergebnis fand sich keine Beeinflussung der proteolytischen Aktivität des 20S Proteasomen in einer direkten Wechselwirkung mit den affinitätsgereinigten Antikörpern in vitro. Im Gegensatz dazu waren affinitätsgereinigte humane Autoantikörper und Referenzantikörper gegen 20S Proteasomen in der Lage, die Aktivierung des Komplexes durch PA28 zu inhibieren. Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörperwirkung war die Interaktion zwischen 20S

Proteasomen und PA28 nicht durch Immunglobulinpräparate von gesunden Spendern beeinflussbar. Bemerkenswerter Weise konnte der blockierende Effekt der Anti-Proteasomen-Antikörper durch eine steigende Konzentration von PA28 kompetitiv überwunden werden. Eine nähere Charakterisierung der affinitätsgereinigten Anti-Proteasomen-Antikörper ergab den Nachweis einer Reaktivität gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten. Eine Kreuzreaktivität der Anti-Proteasomen-Antikörper gegen PA28 konnte ausgeschlossen werden. Somit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen 20S Proteasomen und PA28 durch Anti-Proteasomen-Antikörper blockiert werden kann. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt von Anti-Proteasomen-Antikörpern die gegen  $\alpha$ -Untereinheiten gerichtet sind, vermittelt wird.

Einschränkend muss aufgrund der gewählten experimentellen Bedingungen auf die *in vitro* Situation mit Verwendung von artifiziellen Substraten in Form von fluorogenen Peptiden hingewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen sind mit physiologischen Substraten des 20S Proteasoms sinnvoll, um insbesondere eine Beeinflussung der Quantität und Qualität der hergestellten Schnittprodukte unter dem Einfluss von Anti-Proteasomen-Antikörpern abzuklären. Die gezeigte Blockade der Proteasomen-Aktivierung durch Anti-Proteasomen-Antikörper ist ein interessantes Ergebnis, das in weiterführenden Experimenten bzgl. seiner pathogenetische Bedeutung weiter abgeklärt werden muss. Die Inhibition der Proteasomenaktivität durch pathophysiologisch auftretende Anti-Proteasomen-Antikörper stellt somit einen neuen Wirkmechanismus von Autoantikörpern dar.

*Brychcy M, Kuckelkorn U, Hausdorf G, Egerer K, Kloetzel PM, Burmester GR, Feist E. Anti-20S proteasome autoantibodies inhibit proteasome stimulation by proteasome activator PA28. Arthritis Rheum. 2006;54:2175-83. Erratum in: Arthritis Rheum. 2006;54:2702.*

#### 4.4 Zirkulierende 20S Proteasomen als Marker für Entzündung und Zelluntergang

*Publikation:*

*Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dörner T, Burmester GR, Kloetzel PM, Feist E. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. J Rheumatol 2002; 29:2045-52.*

**Zusammenfassung:** 20S Proteasomen repräsentieren einen abundanten und ubiquitären Proteinkomplex in eukaryontischen Zellen. Bemerkenswerter Weise war bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen und insbesondere bei Patienten mit Kollagenosen eine hohe Prävalenz von Anti-Proteasomen-Antikörpern nachzuweisen. Deshalb war es Ziel dieser Untersuchung festzustellen, ob 20S Proteasomen in relevanter Konzentration bei Patienten mit autoimmunen Systemerkrankungen freigesetzt werden. Dies könnte ein Hinweis für einen erhöhten Zelluntergang bzw. für eine gestörte Apoptose bei diesen Erkrankungen sein. Deshalb wurde ein Immuno-Assay zum Nachweis von 20S Proteasomen in biologischen Proben entwickelt.

Als serologischer Marker für Zelluntergang ist das 20S Proteasomen insbesondere aufgrund seiner außerordentlichen Stabilität geeignet. Deshalb wurde ein Sandwich-ELISA für den Nachweis von 20S Proteasomen unter Benutzung eines polyklonalen Capture-Antikörpers und eines monoklonalen Detektions-Antikörpers entwickelt. Unter Verwendung von Serum- und Plasmaproben von gesunden Kontrollen wurde ein physiologischer Schwellenwert für zirkulierende Proteasomen von <400 ng/ml (Mittelwert + 2fache Standardabweichung) festgelegt. In weiterführenden Untersuchungen waren bei in einer Vielzahl von systemischen Autoimmunerkrankungen deutlich erhöhte Werte für zirkulierende Proteasomen nachweisbar. Insbesondere bei Patienten mit autoimmuner Myositis, systemischem Lupus erythematodes,

primärem Sjögren-Syndrom, rheumatoider Arthritis und autoimmuner Hepatitis fanden sich stark erhöhte Konzentrationen (>1000 ng/ml) von zirkulierenden Proteasomen in Serum- und Plasmaproben.

Patienten mit einer systemischen Autoimmunerkrankung wiesen im Vergleich zu organspezifischer Autoimmunerkrankung signifikant höhere Werte für zirkulierende Proteasomen auf. In Verlaufsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Proteasomen eng mit der Aktivität von Autoimmunprozessen und zellulärem Untergang korrelieren.

In weiterführenden Untersuchungen erfolgte eine Mikropräparation von zirkulierenden Proteasomen. Diese konnten sowohl in intakter Form mit erhaltener proteolytischer Aktivität als auch in degradierter oder dissoziierter Form aus Serum- und Plasmaproben isoliert werden. Darüber hinaus fand sich eine Inkorporation der Immunoproteasomenuntereinheit LMP7 in zirkulierende Proteasekomplexe. Dies deutet zumindest auf einen teilweisen Ursprung der zirkulierenden Proteasomen aus immunkompetenten Zellen unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  hin.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass zirkulierende Proteasomen in deutlich erhöhter Konzentration bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen nachweisbar sind. Somit repräsentieren zirkulierende Proteasomen einen neuen sensitiven Marker für entzündliche Autoimmunprozesse mit Korrelation zu Krankheitsaktivität. Inwiefern die erhöhten Werte für zirkulierende Proteasomen allein auf einen zellulären Schaden hinweisen oder zusätzlich aus gesteigerten Apoptoseprozessen resultieren

bzw. auf eingeschränkte Clearance-mechanismen hindeuten, muss in weiterführenden Untersuchungen abgeklärt werden.

*Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dörner T, Burmester GR, Kloetzel PM, Feist E. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. J Rheumatol 2002; 29:2045-52.*

## 4.5 Untersuchungen zur Expression von Proteasomenuntereinheiten bei Autoimmunerkrankungen

*Publikationen:*

*Krause S, Kuckelkorn U, Dorner T, Burmester GR, Feist E\*, Kloetzel PM\*.*

*Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. Ann Rheum Dis 2006;65:1021-7.*

*(\*beide Autoren haben gleichwertig zur Arbeit beigetragen)*

*Egerer T, Martinez-Gamboa L, Dankof A, Stuhlmüller B, Dorner T, Krenn V,*

*Egerer K, Rudolph PE, Burmester GR, Feist E. Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 2006;54:1501-8.*

**Zusammenfassung:** Die Rolle des Proteasomensystems bei systemischen Autoimmunerkrankungen ist bisher noch nicht ausreichend untersucht. Dabei ist unklar, ob entzündliche Autoimmunprozesse Auswirkungen auf die Proteasomenexpression durch Induktion von Immununtereinheiten des Proteasoms haben. Außerdem stellt sich die Frage, ob das Proteasomensystem direkt in die Pathogenese von entzündlichen autoimmunen Erkrankungen einbezogen ist. Deshalb erfolgte eine Untersuchung der Expression von Proteasomenunterheiten unter Einschluss der konstitutiven Untereinheiten C3 ( $\alpha 2$ ) und C9 ( $\alpha 3$ ), der Immununtereinheiten LMP2 ( $\beta 1i$ ), LMP7 ( $\beta 5i$ ) und MECL1 ( $\beta 2i$ ) sowie der induzierbaren Untereinheiten des Proteasomenaktivators (PA28 $\alpha$  und  $\beta$ ) bei Patienten mit verschiedenen systemischen Autoimmunerkrankungen inklusive systemischem Lupus erythematodes, primärem Sjögren-Syndrom, autoimmuner Myositis, systemischer Sklerodermie, Vaskulitis und rheumatoider Arthritis. Analysiert wurde zunächst die Expression in PMBC mittels Real-Time-

PCR-Technik. Darüber hinaus erfolgte eine semiquantitative Untersuchung der Proteinexpression mittels Immunoblot.

In dieser ersten Untersuchung zur Expression von Proteasomenuntereinheiten bei systemischen Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Proteasomenunterheiten LMP2, MECL1 sowie der Proteasomenaktivator PA28 auf mRNA-Ebene hochreguliert sind. Auf Protein-Ebene war eine erhöhte Expression von LMP2 ( $\beta$ 1i), LMP7 ( $\beta$ 5i), MECL I ( $\beta$ 2i) sowie von PA28 $\alpha$  festzustellen. Die vergleichende Untersuchung zwischen mRNA- und Proteinebene ergab bei Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom auffälliger Weise eine Defizienz für die Proteasomenuntereinheit LMP2 auf Proteinebene. Dies kann als Hinweis für eine Deregulation in der Proteasomenexpression mit Mangel an der Immununtereinheit LMP2 beim primären Sjögren-Syndrom gewertet werden.

Auf Grundlage der bisherigen Vorstellung zur Struktur des 20S Proteasomen kann dabei davon ausgegangen werden, dass ein Mangel an LMP2 zu einer Störung der Assemblierung des Immunoproteasomen führen muss. Weiterführenden Untersuchungen sind somit insbesondere beim Sjögren-Syndrom erforderlich, um eine Deregulation im Proteasomensystem zu bestätigen und möglicherweise eine pathogenetische Bedeutung einer mangelnden LMP2 Expression auf Proteinebene festzustellen.

Parallel zu den oben beschriebenen Untersuchungen zur Expression von Proteasomenuntereinheiten bei systemischen Autoimmunerkrankungen erfolgte eine gezielte vergleichende Untersuchung der Expression von ausgewählten Proteasomenuntereinheiten in PBMC und im Lippendrüsengewebe von Patienten mit Sjögren-Syndrom. Um einer

krankheitsspezifischen Expression nachzugehen, wurden Patienten mit Trockenheitsbeschwerden des Mundes und der Augen ohne vorliegende autoimmune Sialadenitis als Kontrollgruppe untersucht. Es erfolgte eine Expressionsuntersuchung der Proteasomenuntereinheiten LMP7 und C9, der Th1 und den Th2 assoziierten Chemokinen CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) und CCL2 (MCP-1) sowie CXCL7 (NAP-2), Interleukin 1- $\beta$  und ICOS. Im Ergebnis konnte eine signifikante Hochregulation der Proteasomenuntereinheit LMP7 ( $\beta$ 5i) in den Lippendrüsenbiopsien von Patienten mit Sjögren-Syndrom nachgewiesen werden. Im peripheren Kompartiment war eine Hochregulation von NAP-2 bei Patienten mit Sjögren-Syndrom festzustellen. Auf Proteinebene erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der Expression der Immununtereinheit  $\beta$ 5i zur Bestätigung der Induktion im betroffenen Drüsengewebe bei Sjögren-Syndrom. Dabei fand sich eine signifikante Hochregulation von LMP7 insbesondere im Bereich der infiltrierenden lymphoiden Zellen, jedoch auch im Bereich des Drüsenepithels. Diese Veränderungen waren unabhängig vom Ausmaß der lymphozytären Gewebsinfiltration entsprechend Focusscoring. Somit kann eine gewebespezifische Hochregulation der Proteasomenuntereinheit  $\beta$ 5i auf mRNA- und Proteinebene als charakteristischer Befund für das Sjögren-Syndrom festgestellt werden. Systematische Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven sind jedoch erforderlich, um die diagnostische Bedeutung im Vergleich zum Focusscoring als bisherigen histologischen Standard zu klären.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine Induktion des Immunoproteasoms bei systemischen Autoimmunprozessen hin. Von besonderem Interesse sind die aufgezeigten charakteristischen Veränderungen innerhalb des Proteasomensystems beim Sjögren-Syndrom. Dabei finden sich hier insbesondere krankheits- und gewebespezifische Veränderungen in der Expression von Immununtereinheiten. Darüber hinaus ergeben sich

Hinweise auf eine Deregulation der Proteasomenuntereinheit LMP2 auf Proteinebene. Der Nachweis einer LMP2-Defizienz ist der erste beschriebene molekulare Defekt in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms.

*Krause S, Kuckelkorn U, Dorner T, Burmester GR, Feist E\*, Kloetzel PM\*.  
Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome  
but not in other autoimmune disorders. Ann Rheum Dis 2006;65:1021-7.*

*Egerer T, Martinez-Gamboa L, Dankof A, Stuhlmuller B, Dorner T, Krenn V, Egerer K, Rudolph PE, Burmester GR, Feist E. Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 2006;54:1501-8.*

## 5. Diskussion

### 5.1 Das Ubiquitin-Proteasomensystem in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen

Die bisher vorliegenden limitierten Erkenntnisse zum Ubiquitin-Proteasomensystem ergeben interessante Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Einbeziehung dieser proteolytischen Maschinerie bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Dabei ist das Proteasomen nicht nur physiologisch in Entzündungsprozesse einbezogen, sondern auch selbst ein Ziel-Antigen bei systemischen Autoimmunerkrankungen.

In diesem Zusammenhang ist die Diversität der Immunreaktion gegen das 20S Proteasomen mit Einbeziehung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des Komplexes äußerst bemerkenswert. Anti-Proteasomen-Antikörper sind nicht-krankheitsspezifisch und können bei verschiedenen systemischen Autoimmunerkrankungen und insbesondere Kollagenosen nachgewiesen werden [Arribas et al. 1991; Feist et al. 1996, 1999]. Darüber hinaus wurden sie auch bei Patienten mit Multipler Sklerose und Diabetes mellitus Typ 1 beschrieben [Mayo et al. 2002; Kordonouri et al. 2004]. Dabei sind die Mechanismen, die zur Induktion von Anti-Proteasomen-Antikörpern führen, ungeklärt. Diskutiert werden kann in diesem Zusammenhang eine mögliche Durchbrechung der immunologischen Toleranz durch Freisetzung von Proteasomen. Dies kann durch erhöhten Zellzerfall zum Beispiel im Rahmen von chronisch-entzündlichen Autoimmunprozessen auftreten. Weiterhin unklar ist, ob Anti-Proteasomen-Antikörpern tatsächlich eine pathophysiologische Bedeutung zukommt und insbesondere ob sie direkt zirkulierendes Proteasomen binden können. Dabei könnten diese Antikörper zu einer verbesserten Clearance des freigesetzten Antigens führen. Andererseits ist es aber auch möglich, dass sich Immunkomplexe aus Anti-Proteasomen-Antikörpern und dem zirkulierenden Antigen bilden, die sich unter Umständen im Gewebe ablagern und somit auch zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beitragen könnten.

Bei Krankheitsbildern wie den autoimmunen Myositiden sind Anti-Proteasomen-Antikörper die bisher am häufigsten nachgewiesenen Autoantikörper und können somit zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden [Feist et al. 1996]. Anti-Proteasomen-Antikörper sind darüber hinaus ebenfalls von Bedeutung in der Abgrenzung anderer Autoantikörper und in der Interpretation von ANA-Immunfluoreszenzmustern [Feist et al. 2007]. Da sie mit andern Autoantikörpermustern interferieren können und sich nicht eindeutig allein durch ANA-Screening abgrenzen lassen, ist eine Bestätigung durch spezifische ELISA oder Immunoblotting erforderlich [Feist et al. 2000].

Anti-Proteasomen-Antikörper können mit dem Proteasomenaktivator PA28 um die Bindungsstellen an den  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms konkurrieren [Brychcy et al. 2006]. Dadurch kann eine Inhibition der Aktivierung des Proteasoms vermittelt werden. Unklar ist jedoch, ob diesem Effekt eine tatsächliche Bedeutung zukommt, da zumindest intrazellulär lokalisiertes Proteasomen nicht direkt einer Antikörperbindung zugänglich ist. Allerdings konnte eine Inhibition der enzymatischen Aktivität des jeweiligen Zielantigens auch für Anti-Synthetasen und Anti-Ribosomen Autoantikörper gezeigt werden [Uchiumi et al. 1991; Stacey et al. 1988; Hirakata et al. 1999]. Obwohl einige Arbeiten darauf hinweisen, dass Autoantikörper zum Teil in der Lage sind, eine intakte Zellmembran zu passieren [Ruiz-Arguelles et al. 2003], ist diese Annahme noch wenig experimentell unterlegt. Dennoch sind weiterführende Untersuchungen auch für Anti-Proteasomen-Antikörper bezüglich ihrer Effekte auf Proteasomenaktivität und -funktion in vivo durchaus interessant. Die Blockierung der Wechselwirkung zwischen 20S Proteasomen und PA28 mittels Antikörper gegen  $\alpha$ -Untereinheiten des Proteasomen beschreibt einen neuen Ansatz zur Inhibition der Proteasomenfunktion. Da das Proteasomensystem ein hochinteressantes therapeutisches Target

bei malignen Erkrankungen, aber auch bei Autoimmunerkrankungen darstellt [Kanagasabay et al. 2007; Ishii et al. 2007; Colmegna et al. 2005; Sigal 2006], könnte dieses Wirkprinzip auch für zukünftige Therapiestrategien in Betracht gezogen werden.

Zirkulierende Proteasomen stellen einen wertvollen serologischen Parameter bei systemischen Autoimmunerkrankungen dar, da ihre Serum- und Plasmakonzentration mit entzündlicher Aktivität und Gewebeschädigung korreliert [Egerer et al. 2002]. Bezüglich der Zusammensetzung der zirkulierenden Proteasomen konnte gezeigt werden, dass diese zum Teil durch Immunoproteasomen gebildet werden. Dies deutet auf den teilweisen Ursprung der zirkulierenden Antigene aus lymphatischem Gewebe hin. Eine weitere biochemische Charakterisierung der zirkulierenden Proteasomensubtypen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und gesunden Kontrollen ist inzwischen mit Bestätigung der Annahme erfolgt, dass die Freisetzung der Proteasomen nicht allein aus Blutzellen erfolgt [Zoeger et al. 2006]. Weitere Untersuchungen unter Einbeziehung von Patienten mit Traumata, Sepsis und malignen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom, deuten ebenfalls auf eine diagnostische Bedeutung der zirkulierenden Proteasomen als Marker für Zelluntergang hin [Wada et al. 1993; Stoebner et al. 2005; Roth et al. 2005]. In diesem Zusammenhang ergaben Verlaufsuntersuchungen eine Korrelation von Konzentrationen an zirkulierenden 20S Proteasomen mit der Prognose des Multiplen Myeloms [Jakob et al. 2007]. Somit scheint der Nachweis von zirkulierenden 20S Proteasomen über den Indikationbereich der systemischen Autoimmunerkrankung hinaus einen interessanten neuen diagnostischen Marker darzustellen.

Erste Untersuchungen zur Proteasomenexpression bei Autoimmunerkrankungen ergaben, dass Immunoproteasomen bei systemischen Autoimmunerkrankungen auf mRNA- und Protein-Ebene hochreguliert sind und offensichtlich somit auch aktiv in die Pathomechanismen dieser

Erkrankung einbezogen sind [Krause et al. 2006]. Eine Besonderheit fand sich für das primäre Sjögren-Syndrom, bei dem offensichtlich eine Deregulation innerhalb der Proteasomenexpression vorliegt. Diese Deregulation betrifft insbesondere die Proteasomenuntereinheit LMP2 ( $\beta 1i$ ), die bei Hochregulation auf mRNA-Ebene eine Defizienz auf Protein-Ebene aufweist. Dabei sind als Erklärung für eine erhöhte mRNA von LMP2 ( $\beta 1i$ ) möglich:

- 1.) eine erhöhte mRNA-Stabilität
- 2.) ein erhöhtes mRNA steady-state
- 3.) eine erhöhte Transkriptionsrate für diese Proteasomenuntereinheit

Dem gegenüber ist ein Mangel an LMP2 ( $\beta 1i$ ) Protein möglich aufgrund eines:

- a) post-transkriptionalen Defektes der LMP2 ( $\beta 1i$ ) mRNA
- b) aufgrund einer Störung im Translationsprozess
- c) aufgrund einer reduzierten Proteinstabilität von LMP2 ( $\beta 1i$ )

Somit sind weitere Untersuchungen auf mRNA- und Protein-Ebene bei systemischen Autoimmunerkrankungen sinnvoll, um Regulationsmechanismen von Translation und Transkription im Proteasomensystem aufzudecken.

Dieser erste beschriebene molekulare Defekt beim Sjögren-Syndrom könnte durchaus pathogenetische Bedeutung besitzen, da ein Einbau der Untereinheit LMP2 ( $\beta 1i$ ) für die Assemblierung des Immunoproteasoms essenziell ist. Somit könnte ein Defizit an LMP2 ( $\beta 1i$ ) zu einer Störung der Proteasomenzusammensetzung bzw. -struktur insbesondere unter pro-inflammatorischen Bedingungen führen. Dies könnte zum Beispiel im Falle einer viralen Infektion zu einer gestörten Antigenverarbeitung und somit ineffektiven Immunabwehr mit der Möglichkeit einer Chronifizierung der Infektion führen. Gerade in der Pathogenese des Sjögren Syndroms mit entzündlicher Destruktion von exokrinem Drüsengewebe werden virale

Infektionserkrankungen (ausgelöst z.B. durch EBV oder Coxsackie-Virus) als möglicher Triggerfaktor diskutiert [Triantafyllopoulou et al. 2004; James et al. 2001].

Einen weiteren Hinweis auf eine Aktivierung des Proteasomensystems beim Sjögren Syndrom ergab die krankheitsspezifische Hochregulation der Proteasomenuntereinheit LMP7 ( $\beta 5i$ ) auf mRNA- und Proteinebene im betroffenen Lippendrüsengewebe. Die Expression von LMP7 ( $\beta 5i$ ) war dabei nicht abhängig von der lympho-histiozytären Gewebsinfiltration und stellt somit zusätzlich zum Focusscoring eine neue Möglichkeit zur histologischen Beurteilung von Lippendrüsensbiopsien bei Verdacht auf Sjögren Syndrom dar [Vitali et al. 2002; Chisholm und Mason 1968; Egerer et al. 2006]. Einen weiteren Hinweis auf eine Aktivierung des Proteasomensystems ergab ein Genexpressionsprofil im Lippendrüsengewebe von Patienten mit Sjögren Syndrom im Vergleich zu Gesunden [Hjelmervik et al. 2005]. Dabei konnten mittels mRNA-Microarray eine Hochregulation von Typ-1 Interferon induzierbaren Genen (IFN-Signatur) im Gewebe nachgewiesen werden. Die Immununtereinheiten LMP2 ( $\beta 1i$ ) und MECL1 ( $\beta 2i$ ) wurden dabei unter den 50 am stärksten hochregulierten Genen identifiziert. Auf dem verwendete Chip wird LMP5 ( $\beta 5i$ ) nicht erfasst, so dass erst die ergänzende Untersuchung bestätigte, dass alle drei induzierbaren Proteasomenuntereinheiten auf mRNA-Ebene gleichgerichtet reguliert sind. Ob die nachgewiesene Induktion der Immun-Proteasomenuntereinheiten jedoch tatsächlich zu einer veränderten Proteasomenzusammensetzung und -funktion im betroffenen Gewebe führt und den Ubiquitin-Proteasomen-Stoffwechsel inklusive der Herstellung von antigenen Peptiden für die MHC Klasse-I Präsentation beeinflusst, kann nur in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Schließlich stellt das Proteasomensystem ebenfalls einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz nicht nur bei Patienten mit Tumorerkrankungen wie dem Multiplen Myelom dar, sondern

könnte auch bei systemischen Autoimmunerkrankungen in Zukunft bedeutsam werden. Durch die Verfügbarkeit von selektiven reversiblen Proteasomen-Inhibitoren, wie dem bereits für das Multiple Myelom zugelassenen Medikament Bortezomib (Velcade®), ist ein möglicher Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren bei systemischen Autoimmunerkrankungen im Rahmen von klinischen Studien denkbar. Umso wichtiger sind in diesem Zusammenhang eine weiterführende genaue Charakterisierung der Proteasomenexpression und die Aufdeckung einer Deregulation im Proteasomensystem bei diesen Erkrankungen. Aufgrund der essenziellen Bedeutung des Ubiquitin-Proteasomensystems in der Regulation von entzündlichen Prozessen ist eine Einbeziehung des Proteasomen bei systemischen Autoimmunerkrankungen nahe liegend. Deshalb sind die erfolgten Untersuchungen zum Proteasomensystem bei Autoimmunerkrankungen erst der Beginn einer Auseinandersetzung mit diesem komplexen Proteasesystem und der Aufklärung ihrer Einbeziehung in die Pathogenese.

## 6. Zusammenfassung

Untereinheiten des Ubiquitin-Proteasomensystems sind Zielantigene der Immunreaktion bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Autoantikörper gegen das 20S Proteasomen können dabei in hoher Prävalenz bei Kollagenosen wie der autoimmunen Myositis, dem systemischen Lupus erythematodes und dem primären Sjögren Syndrom nachgewiesen werden. Obwohl diese Autoantikörper keine hohe Krankheitsspezifität aufweisen, haben sie eine Bedeutung in der serologischen Diagnostik insbesondere für den Nachweis und die Differenzierung von Antinukleären Antikörpern (ANA). Bei Patienten mit autoimmuner Myositis stellen Anti-Proteasomen-Antikörper den häufigsten beschriebenen Autoantikörperbefund dar.

Anti-Proteasomen-Antikörper sind ein interessantes Immunphänomen, da sie neben einer präferentiellen Reaktion gegen die Untereinheit C9 ( $\alpha 3$ ) auch gegen andere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Proteasomenkomplexes gerichtet sein können. In vitro konnte eine Blockierung der Wechselwirkung zwischen dem katalytischen 20S Kernkomplex und dem Proteasomenaktivator PA28 durch Anti-Proteasomen-Antikörper gezeigt werden.

Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen wiesen signifikant erhöhte Werte für zirkulierende Proteasomen auf, die somit einen neuen sensitiven Marker für den entzündlichen Prozess mit Korrelation zu Krankheitsaktivität darstellen. Auf Grund der erhaltenen proteolytischen Aktivität kann dabei davon ausgegangen werden, dass die zirkulierenden Proteasomenkomplexe zum Teil in intakter Form vorliegen.

Untersuchungen zur Expression von Proteasomenuntereinheiten bei systemischen Autoimmunerkrankungen ergaben eindeutige Hinweise auf eine Aktivierung des Proteasomensystems mit Hochregulation von bestimmten Immununtereinheiten auf mRNA- und

Proteinebene in PBMC. Beim Krankheitsbild des primären Sjögren Syndroms ergaben sich demgegenüber Hinweise auf eine Deregulation der Untereinheit LMP2 ( $\beta 2i$ ) mit Hochregulation auf mRNA-Ebene und Defizienz auf Proteinebene in PBMC. Als Ausdruck der INF-Signatur konnte eine gewebespezifische Hochregulation der Immunoproteasomen-Untereinheit LMP7 ( $\beta 5i$ ) auf mRNA und Proteinebene in Lippendrüsen bei Patienten mit Sjögren Syndrom nachgewiesen werden.

Gegenwärtig ist die Einbeziehung des Ubiquitin-Proteasomensystems in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen noch nicht ausreichend untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen jedoch eine Beeinflussung des Proteasomensystems durch Entzündungsprozesse bei systemischen Autoimmunerkrankungen. Auf Grund der zentralen Stellung des Ubiquitin-Proteasomensystems zur Aufrechterhaltung von Zellhomöostase, zur Regulation von Entzündungskaskade und Apoptose sowie auch in der Antigengeneration sind diese Untersuchungen eine Grundlage zur Aufdeckung von Mechanismen der Induktion und Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen.

## 7. Literatur

Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, and Ichihara A. Interferon-  $\gamma$  induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 1994;115:257-269

Arribas J, Rodriguez ML, Do Forno RA, and Castano JG. Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1991; 173:423-7

Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 1994;179:901-9

Brummel R, Roberts TL, Stacey KJ, Lenert P. Higher-order CpG-DNA stimulation reveals distinct activation requirements for marginal zone and follicular B cells in lupus mice. *Eur J Immunol* 2006;36:1951-62

Brychcy M, Kuckelkorn U, Hausdorf G, Egerer K, Kloetzel PM, Burmester GR, Feist E Anti-20S proteasome autoantibodies inhibit proteasome stimulation by proteasome activator PA28. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2175-83. Erratum in: *Arthritis Rheum.* 2006;54:2702

Chan, O. and Shlomchik, M. J., A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* 1998;160:51-59

Chisholm DM and Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Path* 1968; 21, 656-660

Colmegna I, Sainz B Jr, Garry RF, Espinoza LR. The proteasome and its implications in rheumatology. *J Rheumatol* 2005;32:1192-8

Coux O, Tanaka K, and Goldberg AL. Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem* 1996; 65:801-847

Dalakas MC. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. *N Engl J Med* 1991; 325:1487-1498

Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dorner T, Burmester GR, Kloetzel PM, Feist E. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol* 2002;29:2045-52

Egerer T, Martinez-Gamboa L, Dankof A, Stuhlmüller B, Dorner T, Krenn V, Egerer K, Rudolph PE, Burmester GR, Feist E. Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2006;54:1501-8

Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidtke G, Micheel B, Hiepe F, Burmester GR, Kloetzel PM. The proteasome  $\alpha$ -type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1996;184:1313-1318

- Feist E, Kuckelkorn U, Dorner T, Donitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM, Burmester GR. Autoantibodies in primary Sjogren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum.* 1999;42:697-702
- Feist E, Dorner T, Kuckelkorn U, Scheffler S, Burmester G, Kloetzel P. Diagnostic importance of anti-proteasome antibodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123:92-7
- Feist E, Brychcy M, Hausdorf G, Hoyer B, Egerer K, Dorner T, Kuckelkorn U, Burmester GR. Anti-proteasome autoantibodies contribute to anti-nuclear antibody patterns on human larynx carcinoma cells. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:5-11
- Früh K, Yang Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\gamma$ . *Curr Opin Immunol* 1999;11:76-81
- Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 2005;174:1775-81
- Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, and Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997; 386:463- 471
- Gromme M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 2002;39:181-202
- Guermonez P, Amigorena S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:257-271
- Hallermalm K, Seki K, Wei C, Castelli C, Rivoltini L, Kiessling R, Levitskaya J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood* 2001;98:1108-15
- Hiepe F, Dorner T. Autoantibodies and antibody-secreting cells. *Z Rheumatol* 2005;64:389-95
- Hjelmervik TOR, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R and Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguish primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52:1534-1544
- Hirakata M, Suwa A, Nagai S, Kron MA, Trieu EP, Mimori T, Akizuki M, Targoff IN. Anti-KS: identification of autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase associated with interstitial lung disease. *J Immunol* 1999;162:2315-20
- Ishii Y, Waxman S, Germain D. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7:359-65
- Jakob C, Egerer K, Liebisch P, Turkmen S, Zavrski I, Kuckelkorn U, Heider U, Kaiser M, Fleissner C, Sterz J, Kleeberg L, Feist E, Burmester GR, Kloetzel PM, Sezer O. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood* 2007;109:2100-5

- James JA, Harley JB, Scofield RH. Role of viruses in systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome *Current Opinion in Rheumatology* 2001;13:370-376
- Jego G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun* 2005;8:124-3
- Kanagasabaphy P, Morgan GJ, Davies FE. Proteasome inhibition and multiple myeloma. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007;8:447-51
- Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:76-81
- Kohler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, and Finley D. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 2001;7:1143-1152
- Kordonouri O, Meyer K, Egerer K, Hartmann R, Scheffler S, Burmester GR, Kuckelkorn U, Danne T, Feist E. Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17:975-81
- Krause S, Kuckelkorn U, Dorner T, Burmester GR, Feist E, Kloetzel PM. Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1021-7
- Kuckelkorn U, Knuehl C, Boes-Fabian B, Drung I, Kloetzel PM. The effect of heat shock on 20S/26S proteasomes. *Biol Chem* 2000;381:1017-23
- Kumar KR, Li L, Yan M, Bhaskarabhatla M, Mobley AB, Nguyen C, Mooney JM, Schatzle JD, Wakeland EK, Mohan C. Regulation of B cell tolerance by the lupus susceptibility gene Ly108. *Science* 2006;312:1665-9
- Marrack P, Kappler J, Kotzin B. Autoimmune diseases: why and where it occurs. *Nat Med* 2001; 8:899-905
- Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol* 2006;24:467-96
- Matthews B, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* 1983; 304:177-179
- Mayo I, Arribas J, Villoslada P, Alvarez DoForno R, Rodriguez-Vilarino S, Montalban X, De Sagarra MR, Castano JG. The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain*. 2002;125:2658-67
- Mountz JD, Wu J, Cheng J, and Zhou T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1415-1420

Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1995;5:323-358

Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:192-201

Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. Identification of MECL-1 (LMP10) as the third IFN- $\gamma$ -inducible proteasome subunit. *J Immunol* 1996;156:2361-2364

Norbury CC, Basta S, Donohue KB, Tschärke DC, Princiotta MF, Berglund P, Gibbs J, Bennink JR, Yewdell JW. CD8<sup>+</sup> T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* 2004;304:1318-21

Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*. 2006;117:443-51

O'Hanlon TP, Miller FW. T cell-mediated immune mechanisms in myositis. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:503-509

Orlowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 2000;383:1-16

Pasare C, Medzhitov R: Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299:1033–1036

Pascual V, Banchereau J and Palucka AK, The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15: 548-556

Reichlin M. Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J Autoimmun* 1998;11:557-61.

Rivett AJ. Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opinion Immunol* 1998;10:110-14

Rivett AJ, Hearn AR. Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins. *Curr Protein Pept Sci* 2004;5:153-61

Rock KL, York IA, Goldberg AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 2004;5:670-7

Roth R, Gee RJ and Mamula MJ. B lymphocytes as autoantigen-presenting cells in the amplification of autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 1997;815: 88-104

Roth GA, Moser B, Krenn C, Roth-Walter F, Hetz H, Richter S, Brunner M, Jensen-Jarolim E, Wolner E, Hoetzenecker K, Boltz-Nitulescu G, Ankersmit HJ. Heightened levels of circulating 20S proteasome in critically ill patients. *Eur J Clin Invest* 2005;35:399-403

Ruiz-Arguelles A, Rivadeneyra-Espinoza L, Alarcon-Segovia D Antibody penetration into living cells: pathogenic, preventive and immuno-therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2003;9:1881-7

Santiago-Schwarz F. Dendritic cells: friend or foe in autoimmunity? *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:115-34

Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 2004;5:1348-58

Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, and Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 1995;268:579-582

Serna A, Ramirez MC, Soukhanova A, Sigal LJ. Cutting edge: efficient MHC class I cross-presentation during early vaccinia infection requires the transfer of proteasomal intermediates between antigen donor and presenting cells. *J Immunol* 2003;171:5668-72

Seufert W, Jentsch S. In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J* 1992; 11: 3077-80

Sigal LH. Basic science for the clinician 40: ubiquitin, programmed protein degradation, and the proteasome. *J Clin Rheumatol* 2006;12:255-8

Silver K, Ferry H, Crockford T, Cornall RJ. TLR4, TLR9 and MyD88 are not required for the positive selection of autoreactive B cells into the primary repertoire. *Eur J Immunol* 2006;36:1404-12

Stacey DW, Skelly S, Watson T, Elkon K, Weissbach H, Brot N. The inhibition of protein synthesis by IgG containing anti-ribosome P autoantibodies from systemic lupus erythematosus patients. *Arch Biochem Biophys* 1988;267:398-403

Stoebner PE, Lavabre-Bertrand T, Henry L, Guiraud I, Carillo S, Dandurand M, Joujoux JM, Bureau JP, Meunier L. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2005;152:948-53

Stohwasser R, Kuckelkorn U, Kraft R, Kostka S, Kloetzel PM. 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences *FEBS Lett* 1996; 383:109-1

Stoltze L, Nussbaum AK, Sijts A, Emmerich NP, Kloetzel PM, Schild H The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol Today* 2000; 21:317-9

Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 2000;1:413-8

Targoff IN. Immune manifestations of inflammatory muscle disease. *Rheum Dis Clin N Am* 1994; 20:857-80

Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos H M. Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism* 2004;50:2897-2902

Uchiumi T, Traut RR, Elkon K, Kominami R. A human autoantibody specific for a unique conserved region of 28 S ribosomal RNA inhibits the interaction of elongation factors 1 alpha and 2 with ribosomes. *J Biol Chem* 1991;266:2054-62

Vallin H, Perers A, Alm GV and Ronnblom L. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN- $\alpha$  inducer in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 1999;163: 6306-6313

Viau M, Zouali M. B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin Immunol* 2005;114:17-26

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; European Study Group on Classification Criteria for Sjogren's Syndrome. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:554-8

Wada M, Kosaka M, Saito S, Sano T, Tanaka K, Ichihara A. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J Lab Clin Med* 1993;121:215-23

Wilk S, Chen WE, Magnusson RP. Properties of the nuclear proteasome activator PA28gamma (REGgamma). *Arch Biochem Biophys* 2000;383:265-71

Wilson NS, Villadangos JA. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv Immunol* 2005;86:241-305

Witt E, Zantopf D, Schmidt M, Kraft R, Kloetzel PM and Kruger E. Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* 2000;301:1-9

Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E, Dahlmann B. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem.* 2006;52:2079-86

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ANA	Anti-nukleäre Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B-cell activating factor
βNA	β-naphthylamide (fluorogenic reporter group)
MACS	Magnetic Cell Sorting
CD	cluster of differentiation
CCL	CC-Chemokin Ligand
CNBr	Cyanogenbromid
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
DC	Dendritische Zellen
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HLA	human lymphocyte antigen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HTLV-1	human T-cell leukemia virus type-1
ICOS	inducible co-stimulator
IFN	Interferon
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz

IL	Interleukine
kDa	Kilo Dalton
LMP	low molecular weight polypeptide
MCA	7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl (fluorogenic reporter group)
MECL	multicatalytic-endoropeptidase-complex like
MHC	major histocompatibility complex
MRP	myeloid-related protein
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localization signal
PA28	Proteasomenaktivator
PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
POMP	proteasome maturation protein
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule-1
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule-1
sELAM-1	soluble endothelial lymphocyte adhesion molecule-1
SOCS-1	suppressor of cytokine signaling-1
TAP	transporter associated with antigen processing
TAX	transcriptional activator of HTLV-1
TEAD	Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 1 mM dithiothreitol)

TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	tumor necrosis factor

## 9. Danksagung

Die enge Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Charité war Grundlage für die dargelegten Untersuchungen zum Proteasomensystem bei Autoimmunerkrankungen. Deshalb möchte ich Herrn Prof. Peter-M. Kloetzel sowie Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn besonders danken für ihre jahrelange umfassende Unterstützung.

Für die Weckung meines wissenschaftlichen Interesses an der klinischen und experimentellen Rheumatologie und maßgeblich Förderung meines Werdegangs bin ich den Herrn Prof. Gerd-R. Burmester, Prof. Thomas Dörner und Prof. Falk Hiepe dankbar.

Herr Dr. Dr. Karl Egerer hat den experimentellen Teil der Arbeit wesentlich unterstützt und stand mir mit seinem wertvollen Rat immer zur Seite. Ausgezeichnet war die Zusammenarbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe mit Frau Sabine Krause, Frau Sonja Scheffler, Herrn Michael Brychey, Herrn Thomas Egerer, PD Dr. Arne Hansen und Herrn Dr. Gert Hausdorf, und sowie auch mit Frau Prof. Olga Kordonouri aus der Kinderklinik der Charité. Es verbleiben eine Anzahl Kollegen und Mitarbeiter, die nicht im Einzelnen aufgezählt werden können. Insgesamt darf ich allen danken, die als Koautoren oder auch durch ihre tägliche Arbeit die Studien dieser Habilitation unterstützt haben bzw. durch ihre Diskussion die Arbeiten bereichert haben.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Maria und Bernhard Feist sowie Monique Jonas, die es mir durch Ansporn und Liebe ermöglicht haben, diese Arbeiten auszuführen.

**10. Erklärung**

§ 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 angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift