

Aus dem Charité Centrum für Grundlagenmedizin CC2  
Institut für Biochemie, Campus Virchow-Klinikum  
Direktor: Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel

## **Habilitationsschrift**

# **Beteiligung von intrazellulären proteolytischen Systemen an der Immunantwort bei Infektionen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Frau Dr. med. Ulrike Seifert

Eingereicht: Oktober 2010

Dekanin: Frau Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. P. van Endert

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Roggendorf

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	3
<b>1. Einleitung</b> .....	4
1.1 Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden.....	4
1.2 Rolle und Funktion des Proteasom-Systems bei der Immunantwort.....	6
1.2.1 Induktion von Immunoproteasomen und Proteasom-Aktivator PA28.....	8
1.2.2 Alternative Funktionen des Immunoproteasoms.....	9
1.2.3 Schnittpräferenzen von Immunoproteasomen und PA28.....	11
1.3 Rolle von TPPII bei der Antigen-Prozessierung.....	11
1.4 Aminopeptidasen im Zytosol und ER.....	13
1.5 Interferenz von viralen Proteinen mit Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie.....	16
<b>2. Ergebnisse</b> .....	18
2.1 HIV-Tat interferiert mit der Aktivierung des 20S Proteasom-Komplexes durch den Proteasom-Aktivator PA28.....	18
2.2 Die proteasomale Generierung des Hepatitis-C-NS3 <sub>1073-1081</sub> -Epitops ist durch eine Mutation in der Epitop-flankierenden Sequenz beeinträchtigt.....	20
2.3 Generierung des HIV-Nef <sub>73-82</sub> CTL-Epitops durch TPPII.....	22
2.4 Virus-induziertes Typ-I-Interferon stimuliert die Bildung von Immunoproteasomen und weiterer Bestandteile der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie (APM).....	24
2.5 Immunoproteasomen erhalten das zelluläre Protein-Gleichgewicht bei IFN-induziertem oxidativen Stress .....	27
<b>3. Übergreifende Diskussion und Ausblick</b> .....	29
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	36
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	38
<b>6. Danksagung</b> .....	50
<b>7. Eidesstattliche Erklärung</b> .....	51

## Abkürzungen

AAF-CMK <i>Ala-Ala-Phe-chloromethylketone</i>	MCMV <i>murine cytomegalovirus</i>
Abb. Abbildung	MCMV pp89 <i>immediate early protein 89</i>
AIDS <i>acquired immunodeficiency syndrom</i>	MECL1 ( $\beta$ 2i) <i>multicatalytic endopeptidase complex-like 1</i>
ALIS <i>aggresome-like induced structures</i>	MHC <i>major histocompatibility complex</i>
APM Antigen-Prozessierungs-Maschinerie	NF-kappaB <i>nuclear transcription factor</i>
BH <i>bleomycin hydrolase</i>	NIH <i>National Institutes of Health</i>
CatS Cathepsin-S	NK-Zellen <i>Natürliche Killerzellen</i>
C-Terminus <i>Carboxy-Terminus</i>	NS3 <i>nicht-strukturelle Region 3</i>
CTL zytotoxische T-Lymphozyten	N-Terminus <i>Aminoterminus</i>
CD <i>cluster of differentiation</i>	PA28 <i>Proteasomaktivator 28</i>
CVB3 <i>Coxsackievirus B3</i>	PLAP <i>placental leucine aminopeptidase</i>
DALIS <i>DC aggresome-like induced structures</i>	Poly (I:C) <i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
DC <i>Dendritische Zellen</i>	PRAME <i>preferentially expressed antigen in melanoma</i>
DRiPs <i>defective ribosomal products</i>	PSA <i>puromycin sensitive aminopeptidase</i>
EAE <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>	ROS <i>reactive oxygen species</i>
EM <i>Elektronenmikroskop</i>	RDP <i>rapidly degraded proteins</i>
ER <i>Endoplasmatisches Retikulum</i>	siRNA <i>short interference RNA</i>
ERAP <i>endoplasmic reticulum aminopeptidase</i>	Tab. <i>Tabelle</i>
HLA <i>human leukocyte antigen</i>	TAP <i>transporter associated with antigen processing</i>
HBV <i>humanes Hepatitis-B-Virus</i>	TCR <i>T-Zell-Rezeptor</i>
HCV <i>humanes Hepatitis-C-Virus</i>	TOP <i>thimet oligopeptidase</i>
HCMV <i>humanes Zytomegalievirus</i>	TPPII <i>tripeptidyl peptidase II</i>
HIV <i>humanes Immunodefizienz-Virus</i>	TRP2 <i>tyrosinase related protein 2</i>
HIV Nef <i>negative factor</i>	UPS <i>Ubiquitin-Proteasom-System</i>
HIV p17 <i>Matrixprotein</i>	
HIV p24 <i>Kapsidprotein</i>	
HIV Tat <i>transactivator</i>	
HSV <i>humanes Herpes Simplex Virus</i>	
HSV ICP47 <i>infected cell peptide, immediate early protein</i>	
IDE <i>insulin degrading enzyme</i>	
INF <i>Interferon</i>	
I $\kappa$ B $\alpha$ <i>inhibitor of the nuclear transcription factor NF-kappaB</i>	
IRAP <i>insulin-regulated aminopeptidase</i>	
kDa <i>Kilodalton</i>	
LAP <i>leucine aminopeptidase</i>	
LCMV <i>lymphocytic choriomeningitis virus</i>	
LMP2, 7 ( $\beta$ 1i/ $\beta$ 5i) <i>low molecular weight protein 2, 7</i>	
L-RAP <i>leukocyte arginine aminopeptidase</i>	
MAGE-A3 <i>melanoma-associated antigen 3</i>	

Eigenzitate sind im Folgenden fett gedruckt

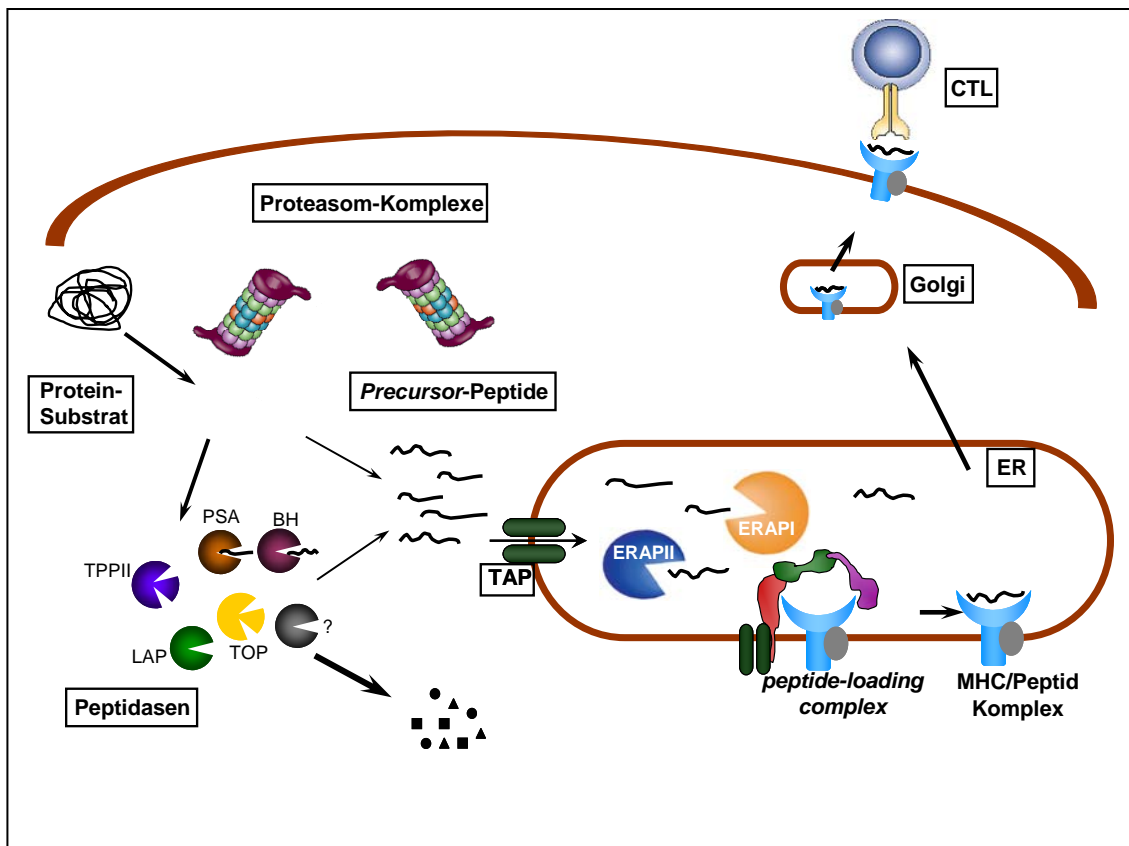
## 1. Einleitung

### 1.1 Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort werden infizierte und entartete Zellen im Wirtsorganismus durch spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eliminiert. Um die Erkennung dieser veränderten Zellen durch CTLs zu gewährleisten, werden Peptidfragmente mit einer Länge von acht bis elf Aminosäureresten (so genannte antigene Epitope) durch intrazelluläre Proteindegradation generiert und an *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentiert. Die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) induziert eine Aktivierung der CTLs (Abb. 1).

Der intrazelluläre Abbau von Proteinen erfolgt in einem „Multistep-Mechanismus“, der mit der Proteindegradation durch Proteasom-Komplexe im Zytosol beginnt (Kloetzel, 2004; **Strehl et al., 2005**). Proteasomale Substrate sind vor allem kurzlebige Proteine (*rapidly degraded proteins*, RDPs), zu denen auch fehlerhafte Translationsprodukte, sog. DRiPs (*defective ribosomal products*), gezählt werden (Qian et al., 2005; Qian et al., 2006; Reits et al., 2000; Schubert et al., 2000). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass die Peptid-Generierung aus DRiP-Vorläufern in der Zelle unterschiedlich ausgeprägt erfolgt (Lev et al., 2010). Die Fraktion der neu synthetisierten Proteine wird innerhalb von wenigen Minuten durch das Proteasom-System abgebaut. Da viele Proteine in der Regel längere Halbwertszeiten (mittlere Halbwertszeit zwischen 1-2 Tagen (Goldberg und Dice, 1974)) aufweisen, ermöglicht dieser Mechanismus dem Immunsystem, zeitnah auf Infektionen zu reagieren.

Im Anschluss an die proteasomale Generierung von Vorläufer-Peptiden werden diese jedoch größtenteils durch Peptidasen im Zytosol abgebaut, so dass etwa nur 1% der initial durch das Proteasom generierten Peptide zur Präsentation an die Zelloberfläche gelangen (Reits et al., 2003). Die anschließende Translokation der Peptide in das Endoplasmatische Retikulum (ER) erfolgt über *transporter associated with antigen processing* (TAP-Transporter). Im ER werden *Precursor*-Peptide durch ER-Aminopeptidasen (ERAP1 und ERAP2) weiter *getrimmt*, wobei korrekt prozessierte Epitope direkt an neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle binden können (Saveanu et al., 2005a). Zusammen mit den MHC-Molekülen werden die antigenen Peptide über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert.



**Abb. 1: MHC-Klasse-I-Epitop-Generierung** (Erläuterungen siehe Text).

TAP – transporter associated with antigen processing; MHC – major histocompatibility complex, CTL – cytotoxic T lymphocyte, TPPII – tripeptidyl peptidase II, PSA – puromycin sensitive aminopeptidase, BH – bleomycin hydrolase, LAP – leucine aminopeptidase, TOP – thimet oligopeptidase, ERAP – ER-aminopeptidase, ER – Endoplasmatisches Retikulum

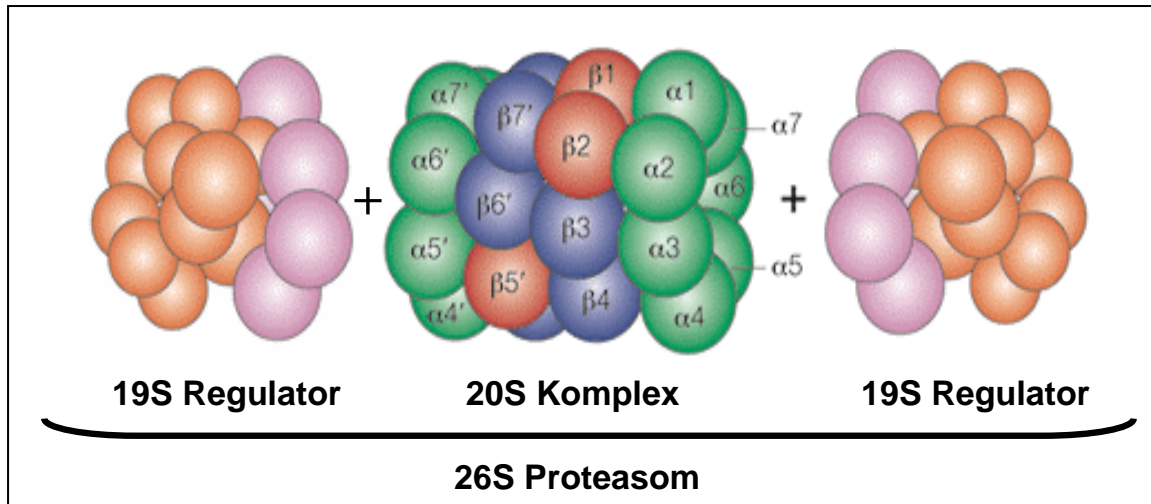
Professionell Antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen (DCs) oder Makrophagen, sind darüber hinaus in der Lage, auch exogene Antigene zu prozessieren und an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden zu präsentieren. Dieser Mechanismus wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Immunantwort und beim *priming* von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Heath et al., 2004). Im Wesentlichen gibt es zwei Formen der Kreuzpräsentation: zum einen den Phagosom-Zytosol Weg, bei dem der Abbau der Antigene im Zytosol mit Hilfe von Proteasomen und Ubiquitin-konjugierenden Enzymen erfolgt (Ebstein et al., 2009; Rock und Shen, 2005). Zum anderen existiert der sogenannte vakuoläre Weg, bei dem die Antigene bereits im Phagosom z.B. durch Cathepsin-S zu Peptiden prozessiert werden (Rock und Shen, 2005).

## 1.2 Rolle und Funktion des Proteasom-Systems bei der Immunantwort

Den entscheidenden initialen Hinweis, dass Proteasomen maßgeblich an der Generierung von MHC-Klasse-I-Epitopen beteiligt sind, ergaben Inhibitorstudien, bei denen die Wirkung spezifischer Proteasom-Inhibitoren im zellulären System analysiert wurde. Es zeigte sich, dass durch Proteasom-Inhibition nicht nur die Präsentation spezifischer Epitope an der Zelloberfläche, sondern auch der Gesamt-Bestand an MHC-Klasse-I-Molekülen vermindert ist (Rock et al., 2002). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des Proteasoms an der Immunantwort ergaben sich aufgrund der Beobachtung, dass zwei durch Zytokin stimulierbare Proteasom-Untereinheiten in der MHC-Klasse-II-Region kodiert sind (Aki et al., 1994; Ortiz-Navarrete et al., 1991).

Generell ist das Ubiquitin-Proteasom-System das zentrale System zur Degradation von Proteinen im Nukleus und Zytoplasma und damit entscheidend für die Erhaltung der zellulären Proteinhomöostase (Ciechanover, 2005). Zum Abbau bestimmte Proteine werden in einem Drei-Schritt-Mechanismus ATP-abhängig mit einer Ubiquitin-Kette versehen. Damit ist das Proteasom-System auch an der Regulation zellulärer Prozesse wie der Zellteilung, Differenzierung, Apoptose, Transkription, DNA-Reparatur und Signaltransduktion beteiligt (Coux et al., 1996; Schwartz und Ciechanover, 1999).

Zur Generierung von Peptiden werden Proteine durch das 26S Proteasom abgebaut, das aus einem katalytisch aktiven 20S Kern-Komplex besteht, der wiederum mit einem oder zwei regulatorischen 19S Komplexen interagieren kann (Glickman und Maytal, 2002; Kloetzel, 2001). Analysen der Kristallstruktur des 20S Proteasom-Komplexes aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass der 20S Komplex aus 28 Untereinheiten aufgebaut ist, die in vier heptameren Ringen angeordnet sind. Die äußeren Ringe enthalten die alpha-Untereinheiten ( $\alpha 1-\alpha 7$ ), deren N-Termini das so genannte *gate* bilden, durch das die Substrate in das Proteasom gelangen bzw. Produkte freigesetzt werden können. Die beiden inneren Ringe des 20S Komplexes werden von den beta-Untereinheiten ( $\beta 1-\beta 7$ ) gebildet, von denen  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  katalytisch aktive Zentren aufweisen (Groll et al., 1997; Groll et al., 2000) (Abb. 2).

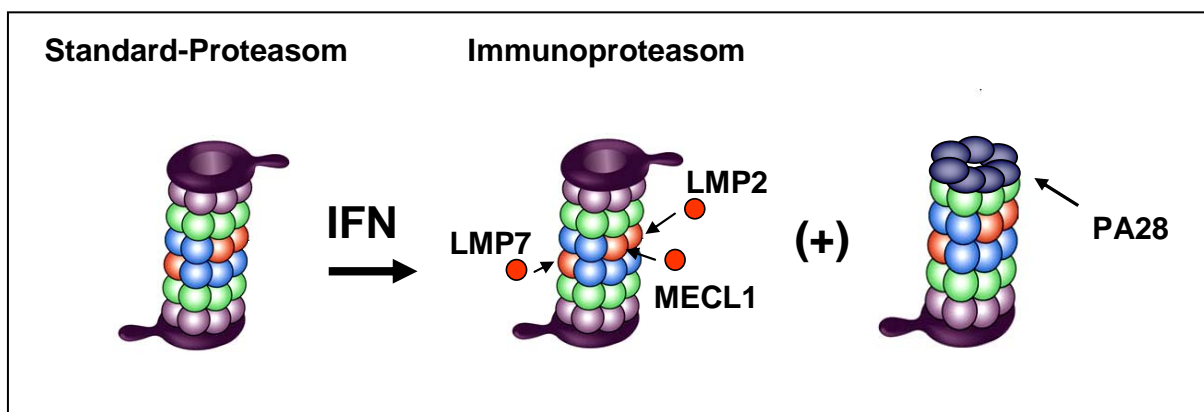


**Abb. 2: Zusammensetzung des 26S Proteasom-Komplexes.** Der 20S Komplex stellt die katalytisch aktive Einheit des 26S Proteasoms dar mit den alpha-Untereinheiten, gezeigt in grün, den aktiven beta-Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  in rot und den inaktiven beta-Untereinheiten, dargestellt in blau. Der 20S Komplex kann mit ein oder zwei 19S Regulator-Komplexen interagieren, die die Aufnahme des Substrats in den katalytischen Kern-Komplex vermitteln (aus Kloetzel, 2001).

Proteasomen gehören zur Familie der Ntn-Hydrolasen (N-terminal nukleophile), da die proteolytisch aktiven beta-Untereinheiten einen N-terminalen Threoninrest enthalten, dessen Hydroxylgruppe als Nukleophil beim Angriff der Peptidbindung fungiert (Kloetzel, 2001). Anhand von Untersuchungen mit Peptidsubstraten können den katalytisch aktiven Untereinheiten verschiedene Schnittpräferenzen zugeordnet werden:  $\beta 1$  spaltet Peptidbindungen bevorzugt nach sauren Resten und weist Caspase-ähnliche Aktivität auf,  $\beta 2$  hydrolysiert die Peptidbindung nach basischen Resten und ist mit einer Trypsin-ähnlichen Aktivität ausgestattet, während  $\beta 5$  eine chymotryptische Aktivität aufweist mit einer Schnittpräferenz nach hydrophoben bzw. aromatischen Resten (Orlowski und Wilk, 2000). In vollständigen Proteinsequenzen kann das Proteasom jedoch nach jeder Aminosäure spalten, bevorzugt nach basischen und hydrophoben Resten (Boes et al., 1994). Dabei ist die Schnittpräferenz auch abhängig von der umgebenden Aminosäuresequenz (Kloetzel, 2001; Nussbaum et al., 1998). Die durch das Proteasom generierten Peptide variieren in ihrer Länge zwischen drei und fünfundzwanzig Aminosäuren mit einer durchschnittlichen Länge von sieben bis acht Aminosäuren (Dahlmann, 2005). Für die Generierung von Peptiden, die geeignet sind an MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden, bedeutet dies, dass der größte Teil der proteasomal generierten Peptidfragmente zu kurz ist für eine Bindung an MHC-Moleküle (<7 Aminosäurereste), ein geringer Anteil direkt gebunden werden kann (<5%) und eine größere Peptidfraktion (ca. 20%) zu lang für eine Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle ist und durch Peptidasen im Zytosol oder ER auf die korrekte Länge *getrimmt* werden muß (Kisselev et al., 1999).

### 1.2.1 Induktion von Immunoproteasomen und Proteasom-Aktivator PA28

Unter Infektionsbedingungen wird durch eine vermehrte Sekretion von Typ-II-Interferon (IFN- $\gamma$ ), das aus CTL oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) stammt, die Bildung von Immunoproteasomen induziert (Frentzel et al., 1994; Groettrup et al., 1997; Nandi et al., 1997). Dabei werden die konstitutiven Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 des Standard-Proteasoms durch die IFN- $\gamma$ -induzierbaren homologen Immununtereinheiten  $\beta$ 1i/LMP2,  $\beta$ 2i/MECL1 und  $\beta$ 5i/LMP7 im Rahmen einer *de novo* Synthese ersetzt. Durch den Einbau dieser Immununtereinheiten in den zellulären Proteasom-Pool sind Zellen in der Lage, die proteasomale Antigen-Prozessierung viraler Antigene im Sinne einer verbesserten MHC-Klasse-I-Epitop Präsentation zu beeinflussen (Chen et al., 2001; Kloetzel, 2004; Toes et al., 2001) (Abb. 3). Die verstärkte Bildung von Immunoproteasomen kann auch durch die Freisetzung von Typ-I-IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) induziert werden, das beispielsweise aus Fibroblasten und anderen Virus-befallenen Zellen während der frühen Immunantwort auf eine Infektion hin freigesetzt wird (Shin et al., 2006). Ebenfalls durch Interferone stimulierbar ist die Expression des Proteasom-Aktivators PA28, der sich aus drei alpha- und vier beta-Untereinheiten zusammensetzt (Ahn et al., 1995). PA28 kann wie der 19S Regulator an die alpha-Ringe des 20S Komplexes binden, das *gate* öffnen und durch einen erhöhten proteasomalen Substratdurchsatz zu einer verstärkten Generierung MHC-Klasse-I-gebundener Epitope führen (Whitby et al., 2000).



**Abb. 3: Zusammensetzung von Standard-Proteasomen und Immunoproteasomen.** Durch Interferone werden die Immununtereinheiten  $\beta$ 1i/LMP2,  $\beta$ 2i/MECL1 und  $\beta$ 5i/LMP7 induziert, und damit die Bildung von Immunoproteasomen. Ebenfalls durch Interferon stimulierbar ist der Proteasom-Aktivator PA28.

Durch die vermehrte PA28-Expression können auch Hybridproteasom-Komplexe entstehen, die auf der einen Seite mit einem PA28 Regulator, auf der anderen mit einem 19S Regulator-Komplex interagieren (Tanahashi et al., 2000). Die Menge dieser Hybridproteasomen ist vergleichsweise hoch mit einem prozentualen Anteil von ca. 20% am zellulären Proteasom-



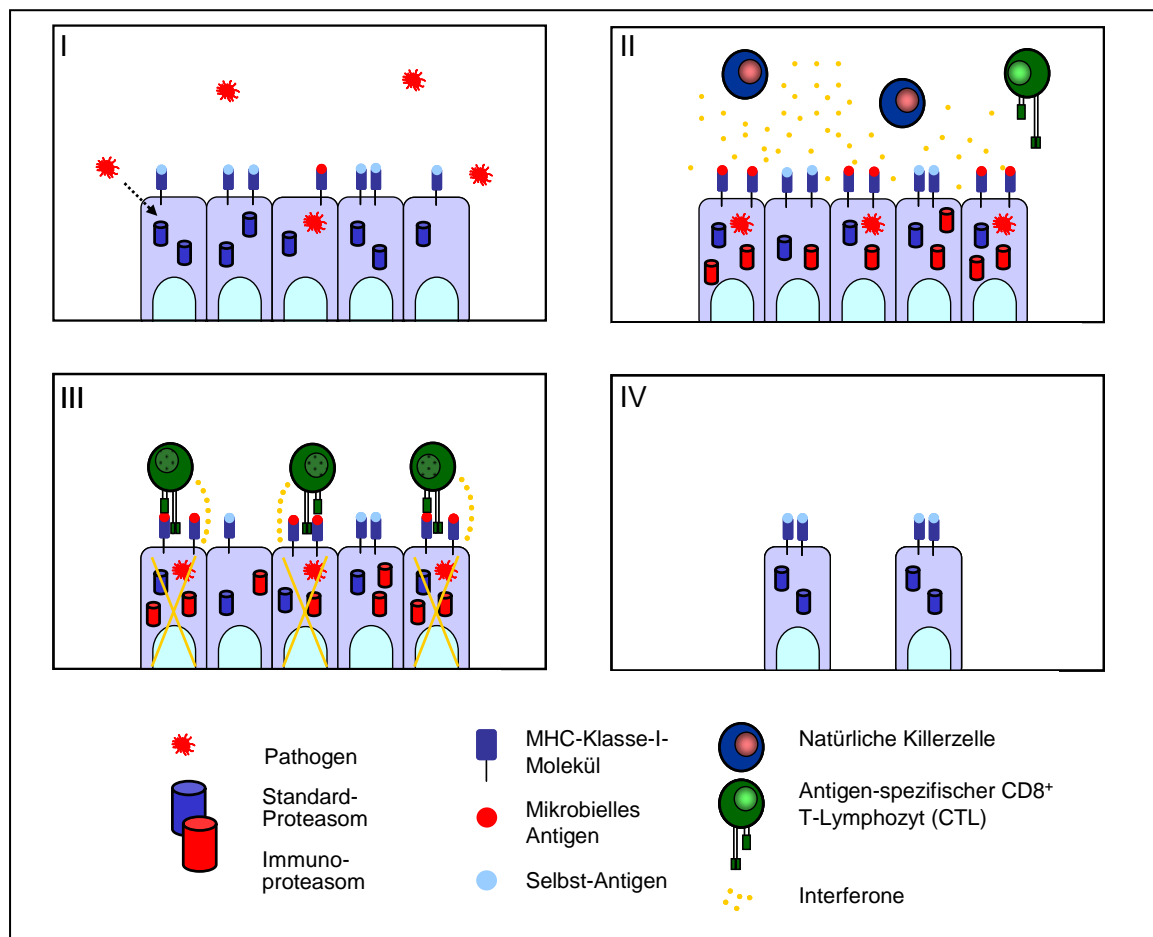
Pool. Vergleichende Aktivitäts-Analysen von Hybridproteasomen und Proteasomen mit PA28 oder 19S Regulatoren auf beiden Seiten zeigen jedoch keine Unterschiede (Kopp et al., 2001). Eine weitere Proteasom-Sonderform wird in kortikalen Epithelzellen des Thymus exprimiert und ist offenbar an der positiven T-Zell-Selektion im Thymus beteiligt. Diese Thymoproteasomen sind aus einer veränderten  $\beta 5$ -Untereinheit ( $\beta 5t$ ) in Kombination mit  $\beta 1i$ - und  $\beta 2i$ -Untereinheiten zusammengesetzt. Bei Fehlen der  $\beta 5t$ -Untereinheit in  $\beta 5t$ -defizienten Mäusen kommt es zu einer beeinträchtigten Entwicklung von  $CD8^+$  T-Zellen (Murata et al., 2007). Interessanterweise werden die Immununtereinheiten in diesen Epithelzellen erst durch eine Infektion oder durch Stimulation mit  $IFN-\gamma$  induziert (Nil et al., 2004).

### 1.2.2 Alternative Funktionen des Immunoproteasoms

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Betrachtungen erscheint es zunächst erstaunlich, dass das Fehlen einzelner Immununtereinheiten nicht generell zu einer veränderten T-Zell-Antwort oder einer veränderten Hierarchie bei der Bildung von T-Zell-Epitopen führt (Nussbaum et al., 2005; Strehl et al., 2006). Darüber hinaus weist die Beobachtung, dass unter Infektionsbedingungen auch in nicht-infizierten Zellen ohne die Notwendigkeit einer verbesserten Antigenprozessierung vermehrt Immunoproteasomen gebildet werden, darauf hin, dass Immunoproteasomen wichtige Funktionen außerhalb der Antigen-Prozessierung besitzen (Yewdell, 2005). Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese ergibt die Analyse von T-Lymphozyten, die einen besonders hohen Anteil an Immunoproteasomen aufweisen und als Effektor-Zellen nicht an der Antigen-Prozessierung beteiligt sind.

Untersuchungen an  $\beta 1i/LMP2$ -defizienten Mäusen hingegen zeigen, dass bei Fehlen der Immununtereinheit  $\beta 1i/LMP2$  verschiedene Parameter, wie die Funktion von B-Zellen, die T-Helferzell-Aktivität und die Zytokin-Sekretion dendritischer Zellen beeinträchtigt sind, wobei dies auf eine veränderte NF-kappaB-Aktivität und nicht auf eine eingeschränkte Proteindegradation zurückzuführen ist (Hensley et al., 2010). Die Inhibition der Immunoproteasom-Untereinheit  $\beta 5i/LMP7$  mit spezifischen Inhibitoren führt zu einem Ausheilen von Rheumatoider Arthritis sowie zu einem mildereren Verlauf einer experimentellen Colitis (Muchamuel et al., 2009; Basler et al., 2010). Desweiteren sind Immunoproteasomen essentiell beim Schutz von Zellen gegen oxidierte Protein-Aggregate, die im Rahmen einer Infektion als Reaktion auf die Freisetzung von Interferonen gebildet werden. Dieser durch Immunoproteasomen vermittelte protektive Effekt ist insbesondere wichtig für den Erhalt der Zellintegrität im infizierten Gewebe (Abb. 4) (Seifert und Krüger, 2008; Seifert et al., 2010).

Eine zu starke Expression von Immununtereinheiten stellt auf der anderen Seite einen toxischen Faktor für Zellen dar. Strehl et al. konnten zeigen, dass im zellulären System der Anteil an Immunproteasomen 70% nicht übersteigt (Strehl et al., 2006). Betrachtet man unterschiedliche Zellen, die potentielle Zielzellen (*targets*) für eine CTL-Antwort sind, findet man Proteasom-Mischformen, die sowohl Standard- als auch Immununtereinheiten beinhalten, so genannte Intermediär-Proteasomen (Dahlmann et al., 2000; Dahlmann et al., 2001). Diese Proteasom-Subtypen sind auch als eine dominante Population in HeLa-Zellen nach IFN- $\gamma$ -Stimulation zu finden, wobei Standard- und Immununtereinheiten innerhalb der zwei beta-Ringe asymmetrisch verteilt sein können. Sie unterscheiden sich darüber hinaus in ihrer katalytischen Aktivität und durch eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung (Klare et al., 2007). Trotz des Vorherrschens dieser Proteasom-Populationen in Targetzellen ist ihre Funktion und das Entstehen dieser Komplexe bislang nicht geklärt.



**Abb. 4: Rolle von Immunproteasomen beim Erhalt der zellulären Integrität.** (I) Infektion eines Gewebe-Verbandes mit Pathogenen, vereinzelt werden mikrobielle Antigene präsentiert. (II) Interferon-Sekretion durch CTL und NK-Zellen, daraufhin vermehrte Bildung von Immunproteasomen und Präsentation von mikrobiellen Antigenen. (III) Zellen, die bakterielle bzw. virale Antigene präsentieren, werden von spezifischen CTL eliminiert. (IV) Nicht-infizierte Zellen, in denen geschädigte Proteine durch Immunproteasomen abgebaut werden, überleben und kehren in ihren Ausgangszustand zurück (aus Seifert und Krüger, 2008).

### 1.2.3 Schnittpräferenzen von Immunoproteasomen und PA28

Durch den Einbau der Immununtereinheiten verändern sich die Schnittpräferenzen des 20S Proteasoms. Im Vergleich zum Standard-Proteasom werden vom Immunoproteasom unterschiedliche aber auch überlappende Peptid-Poole generiert (Toes et al., 2001).

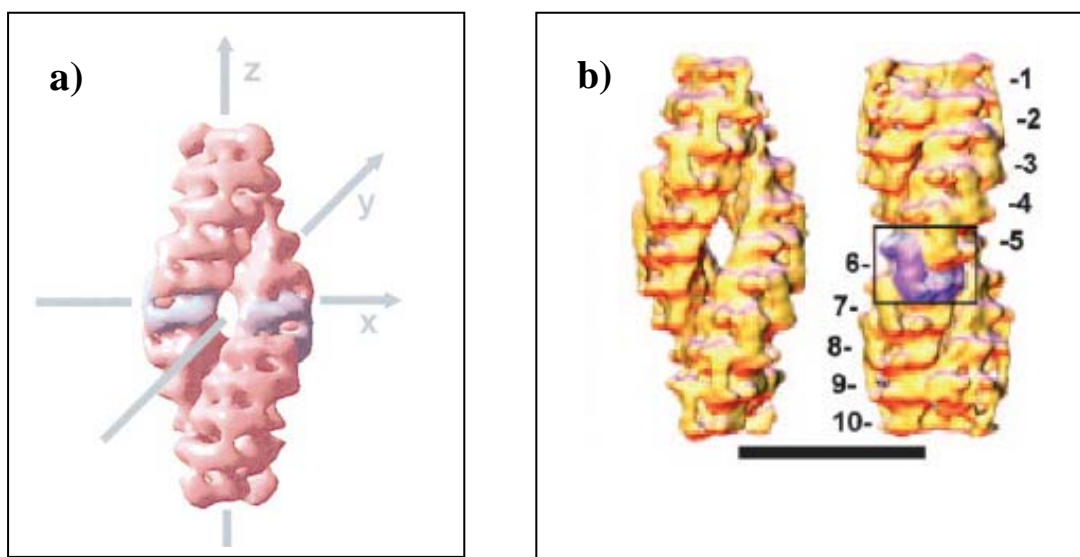
Dabei lässt sich anhand von Prozessierungs-Experimenten mit Peptidsubstraten viralen Ursprungs zeigen, dass Immununtereinheiten einen positiven Effekt auf die Generierung viraler Epitope ausüben, dargestellt am Beispiel von Epitopen der HBV (*hepatitis B virus*) core-Region, des HCV-NS3 (*hepatitis C virus nonstructural region 3*)-Proteins sowie des Nukleoproteins des Influenza-A-Virus (Sijts et al., 2000; **Seifert et al., 2004**; Van Kaer et al., 1994). Im Gegensatz dazu sind einige Epitope beschrieben worden, die durch Immunoproteasomen vermindert generiert werden. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Epitope, die aus körpereigenen Proteinen (Selbstantigenen) stammen (Chapatte et al., 2006; Chapiro et al., 2006; Morel et al., 2000). Wie es genau zur Generierung bzw. Zerstörung mancher Epitope kommt, ist bislang nicht geklärt.

PA28 kann ebenfalls eine verbesserte Epitop-Generierung induzieren und ist für die Bildung des Epitops des Melanomassoziierten *tyrosinase related protein* (TRP<sub>2360-368</sub>) sogar essentiell (Sun et al., 2002). Allerdings bleiben auch viele Epitope in ihrer Generierung durch PA28 unbeeinflusst, was sich in einer unveränderten MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche widerspiegelt (Kloetzel, 2004). Untersuchungen zum Schnittverhalten von PA28 zeigen, dass Proteasom-PA28-Komplexe bereits etablierte, aber untergeordnete Schnittstellen mit höherer Präferenz nutzen. Die Information für die Schnittpräferenz von Proteasom-PA28-Komplexen scheint dabei in der N-terminalen Region von *Precursor*-Peptiden zu liegen (**Textoris-Taube et al., 2007**).

### 1.3 Rolle von TPPII bei der Antigen-Prozessierung

Das Proteasom-System ist definiert als das wichtigste extralysosomale Protease-System, das Proteine degradieren und MHC-Klasse-I-Epitope, insbesondere am C-Terminus, generieren kann. Vergleicht man jedoch die proteasomale Prozessierung der Epitope verschiedener MHC-Klasse-I-Haplotypen, zeigt sich eine unterschiedliche Haplotyp-abhängige Sensitivität der Epitop-Generierung nach Proteasominhibition (Luckey et al., 2001). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass einige Epitope nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß vom Proteasom-System generiert werden. Analysen an Proteasom-Inhibitor adaptierten Zellen zeigen, dass andere im Zytosol der Zelle lokalisierte Enzym-Systeme in Ausnahmesituationen Proteasom-Funktionen übernehmen können (Wang et al., 2000). Eine

enzymatische Aktivität wurde identifiziert als *tripeptidyl peptidase II* (TPPII), eine hochmolekulare Serin-Peptidase (Partikelgröße im EM zwischen 5 und 9 MD) vom Subtilisin-Typ, die sequentiell Tripeptide vom freien N-terminalen Ende größerer Polypeptide abspaltet (Balów et al., 1986; Tomkinson et al., 1987; Geier et al., 1999; Tomkinson und Lindas, 2005) (Abb. 5). Obwohl TPPII generell eine breite Substratspezifität aufweist, gibt es Sequenzen, nach denen das Enzym bevorzugt schneidet, bzw. Aminosäurereste, die das Spalten von TPPII verhindern. Insbesondere wirken sich Prolin-Reste negativ auf die Exopeptidase-Aktivität von TPPII aus (Tomkinson und Lindas, 2005). Neben der Exopeptidase-Aktivität beinhaltet TPPII auch eine geringe Endopeptidase-Aktivität mit einer Schnittpräferenz nach Arginin- und Lysin-Resten (Geier et al., 1999; Tomkinson und Lindas, 2005). Strukturanalysen im Mammalia-System und in der *Drosophila*-Fliege zeigen, dass der oligomere Enzymkomplex aus Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 138 kDa bzw. 150 kDa besteht (Geier et al., 1999; Rockel et al., 2002). Interessanterweise resultiert eine Dissoziation des TPPII-Komplexes in einer zehnfach geringeren Aktivität (Macpherson et al., 1987). In TPPII-Komplexen, die aus *Drosophila*-Fliegen isoliert wurden, sind die Untereinheiten zu einer „Superstruktur“ verknüpft. Dieser Komplex ist aus zwei umeinander gewundenen segmentierten Strängen aufgebaut. Jeder Strang besteht dabei aus zehn Segmenten (Dimere), die einen zentralen Kanal umschließen (Rockel et al., 2002; Rockel et al., 2005) (Abb. 5). Die katalytischen Reste (Asp44, His272 und Ser462) liegen in Kammern, die durch jeweils zwei Dimere gebildet werden. Durch dieses System von aneinander geknüpften Kammern sind die aktiven Zentren, ähnlich wie beim Proteasom-System, in einzelne Kompartimente unterteilt (Chuang et al., 2010).



**Abb. 5: Struktur von TPPII.** a) Rekonstruktion von TPPII aus *Drosophila* anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. b) Modell des Aufbaus von TPPII, Erläuterungen siehe Text (aus Rockel et al., 2002 und 2005).

Untersuchungen zur Rolle von TPPII bei der MHC-Klasse-I-Prozessierung ergaben bislang kontroverse Befunde: einerseits wurde gezeigt, dass TPPII die Epitop-Generierung bzw. Epitop-Zerstörung vermittelt, andererseits, dass TPPII keinen wesentlichen Einfluss auf die MHC-I-Epitop-Prozessierung ausübt. Initiale Beobachtungen von Reits et al. deuten in diesem Zusammenhang darauf hin, dass ein Großteil der proteasomalen Prozessierungsprodukte Substrate für TPPII sind und im weiteren Verlauf durch TPPII *getrimmt* werden, um die passende Größe zur Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen zu erlangen (Reits et al., 2004). Dieser Befund würde mit der Präferenz von TPPII übereinstimmen, vorwiegend längere Peptide (> 14 AS) abzubauen. Kürzlich durchgeführte Analysen an TPPII-defizienten Mäusen zeigen jedoch einen geringen negativen Effekt von TPPII auf die MHC-Klasse-I-Expression, der im Wesentlichen auf einer Zerstörung von langen Epitop-*Precursor*-Peptiden beruht (Firat et al., 2007a; Kawahara et al., 2009).

Betrachtet man die Rolle von TPPII bei der Generierung spezifischer Epitope, gibt es sowohl Beispiele für Epitop-Generierung (Diekmann et al., 2009; Grauling-Halama et al., 2009; Guil et al., 2006; Levy et al., 2002; Schnurr et al., 2009) als auch Epitop-Zerstörung (Preta et al., 2008) und fehlende Effekte von TPPII auf die Epitop-Prozessierung (Basler und Groettrup, 2007). Eine Sonderform stellt die Generierung des HIV-Nef<sub>73-82</sub>-Epitops dar, das Proteasom-unabhängig durch die Endopeptidase-Aktivität von TPPII generiert wird (Seifert et al., 2003). Zusammengefasst ist der Einfluss von TPPII auf die MHC-Klasse-I-Generierung geringer als erwartet. Unter bestimmten Voraussetzungen jedoch, wie z.B. in maligne transformierten Zellen, in denen die Funktion des Proteasom-Systems beeinträchtigt ist, kann TPPII einzelne proteasomale Funktionen übernehmen (Gavioli et al., 2001).

Neuere Befunde weisen auf alternative Funktionen von TPPII hin, wie z.B. Einfluss auf die Zellalterung und Zelltod, sowie auf die Reparatur von DNA-Schäden (Huai et al., 2008; Hong et al., 2007; Tsurumi et al., 2009).

#### **1.4 Aminopeptidasen im Zytosol und ER**

Neben TPPII gibt es weitere Peptidasen, sowohl im Zytosol als auch im ER-Kompartiment, die an der Prozessierung N-terminal verlängerter proteasomal generierter *Precursor*-Peptide beteiligt sind. Im Zytosol sind die Peptidasen Leucin-Aminopeptidase (LAP, durch IFN- $\gamma$  induzierbar), Bleomycin Hydrolase (BH), Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) und Thimet Oligopeptidase (TOP) identifiziert worden, im ER die IFN- $\gamma$ -stimulierbaren ER-aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2 (Beninga et al., 1998; Stoltze et al., 2000; Saric et al.,

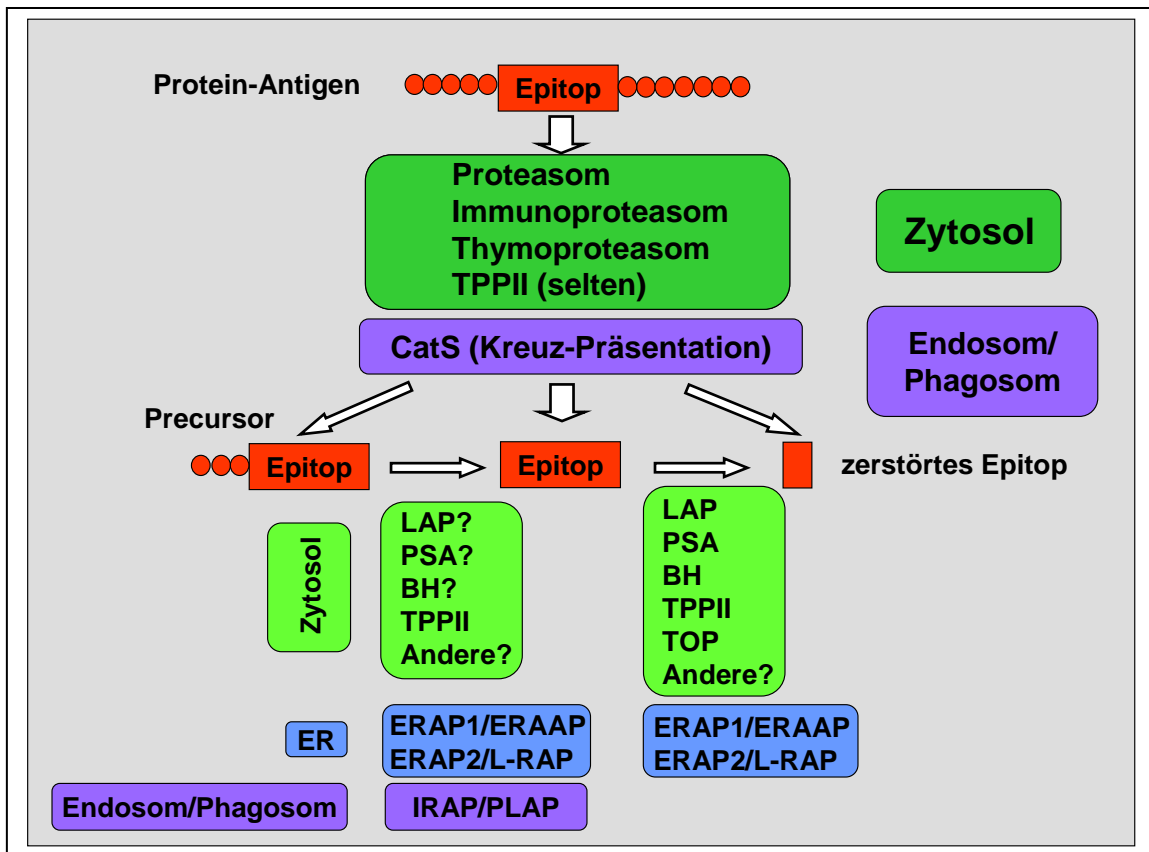
2004; Saric et al., 2002; Tanioka et al., 2003). Obwohl *in vitro* Prozessierungs-Analysen der Aminopeptidasen LAP, PSA und BH zeigen, dass diese Peptidasen in der Lage sind, Peptide zu *trimmen*, weisen Untersuchungen an *knock out* Mäusen keine wesentlichen Änderungen in der Epitop-Prozessierung und geringe Veränderungen der MHC-Klasse-I-Expression auf (Towne et al., 2005, Towne et al., 2008; Towne et al., 2007). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kann im humanen Zellsystem HLA-Allel-abhängig eine unterschiedliche MHC-I-Expression nach *knockdown* von BH und PSA detektiert werden (Kim et al., 2009). Die überwiegend negativen Daten zu diesen Aminopeptidasen in Bezug auf die Epitop-Prozessierung lassen den Schluss zu, dass es überlappende Enzym-Funktionen gibt. Es könnte daher sein, dass sich die *trimming* Aktivität nicht verändert beim Fehlen nur eines Enzyms. Alternativ können andere bislang nicht identifizierte Peptidasen existieren, die einen Einfluß auf die Epitop-Generierung ausüben. Betrachtet man dagegen die ebenfalls zytosolisch lokalisierte Thimet Oligopeptidase (TOP), zeigt sich in humanen Zellen nach TOP *knockdown* eine deutlich erhöhte MHC-I-Expression und nach TOP-Überexpression eine verringerte Präsentation von MHC-Klasse-I-Epitopen. Zusammengefasst bedeutet dies, dass TOP proteasomale Peptide vorwiegend degradiert (York et al., 2003). *In vitro* Analysen zeigen darüber hinaus, dass TOP präferentiell Peptide mit einer Länge von neun bis siebzehn Aminosäuren endoproteolytisch spaltet (Saric et al., 2004). Dieser Peptid-Pool ist damit teilweise überlappend mit der Fraktion der proteasomal generierten Peptide. Vergleichende Untersuchungen im murinen System können für TOP derzeit nicht durchgeführt werden, da eine TOP-defiziente Maus bislang nicht generiert werden konnte.

Im ER-Kompartiment spielt ERAP1 (auch ERAAP – *aminopeptidase associated with antigen processing in the ER* genannt) eine entscheidende Rolle bei der finalen Epitop-Prozessierung. Sowohl in ERAP1-defizienten Mäusen als auch in humanen Zellen mit verminderter ERAP1-Expression konnte eine reduzierte MHC-Klasse-I-Expression und Präsentation von Epitopen detektiert werden (Serwold et al., 2002; Yan et al., 2006; Fruci et al., 2006). ERAP1-Defizienz führt zur Präsentation von instabilen Peptid-MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche (Hammer et al., 2007), deren Instabilität durch Generierung und Bindung von N-terminal verlängerten Vorläufer-Peptiden an MHC-Klasse-I-Moleküle verursacht wird (Blanchard et al., 2010). Interessanterweise sind ERAP-defiziente Zellen in Wild-Typ Mäusen immunogen und lösen eine starke CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort aus. Dies weist darauf hin, dass ERAP-defiziente Zellen ein deutlich verändertes Peptid-Repertoire auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Hammer et al., 2007).

Jedoch gibt es auch Epitope, die gar nicht oder negativ von ERAP1 beeinflusst werden (Firat et al., 2007b; York et al., 2006). Die Prozessierungsaktivität von ERAP1 weist folgende Besonderheiten auf: ERAP1 *trimmt* Peptide bis zu einer Länge von acht oder neun Aminosäuren und stoppt anschließend (York et al., 2002). Diese Peptide können im ER direkt an neu synthetisierte MHC-Moleküle binden (Kanaseki et al., 2006). ERAP2 (auch L-RAP, Leukozyten-Arginin Aminopeptidase genannt), die nur im humanen System vertreten ist, *trimmt* ebenfalls N-terminal, jedoch mit unterschiedlicher Schnittpräferenz. Im Vergleich zu ERAP1, die bevorzugt nach hydrophoben Aminosäureresten spaltet, schneidet ERAP2 nach basischen Aminosäureresten. Beide ER-residenten Aminopeptidasen können im Komplex zusammen die Epitop-Generierung modifizieren (Saveanu et al., 2005b). Epitop-flankierende Sequenzen am N-Terminus bestimmen in diesem Zusammenhang die Frequenz, mit der im ER *getrimmt* wird (Schatz et al., 2008; Hearn et al., 2009). Im Gegensatz zu ERAP1 ist der Anteil von ERAP2 an der ER *trimming* Aktivität bislang jedoch nicht klar definiert. Eine Reduktion von ERAP2 führt beispielsweise nur zu geringen Veränderungen der Gesamt-MHC-Expression. Für eine limitierte Rolle von ERAP2 bei der Epitop-Prozessierung spricht ebenfalls, dass ERAP2 selektiv in verschiedenen humanen Geweben exprimiert ist (Tanioka et al., 2003).

Betrachtet man die ERAP1/2-Expression und die ERAP-Aktivität in verschiedenen Melanom-Zelllinien, zeigen sich stark variierende ERAP-Level mit einer erhöhten Expression bis zu einem kompletten Verlust von ERAP, wobei dies die Generierung und Präsentation eines veränderten Peptid-Repertoires in diesen Tumor-Zellen determiniert (Kamphausen et al., 2010). Auf weiter reichende Funktionen der ER-Aminopeptidasen deutet zudem die Assoziation von ERAP1-Polymorphismen mit dem Auftreten von ankylosierender Spondylitis hin (Haroon und Inman, 2010).

Kürzlich konnte mit IRAP (*insulin-regulated aminopeptidase*, auch PLAP – *placental leucine aminopeptidase* genannt) ein weiteres Enzym im endosomalen Kompartiment identifiziert werden, das eine spezifische Rolle bei der Kreuzpräsentation antigener Peptide spielt und eine andere *trimming* Aktivität als ERAP1 aufweist (Saveanu et al., 2009; Georgiadou et al., 2010). Die an der Antigen-Prozessierung beteiligten Aminopeptidasen sind in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6 An der MHC-Klasse-I-Antigen-Prozessierung beteiligte Proteasen bzw. Peptidasen.** Proteinsubstrate mit einer Epitopsequenz werden von Proteasomen bzw. Immunoproteasomen und im Thymus von Thymoproteasomen geschnitten. In seltenen Fällen kann TPPII Epitope generieren. In dendritischen Zellen werden Antigene zusätzlich im Phagosom gespalten. *Precursor*-Peptide werden im Zytosol durch Aminopeptidasen *getrimmt* oder auch zerstört, wobei TPPII längere Peptide (>14mer) als Substrate nutzen kann. Im ER werden Peptide weiter durch ER-Aminopeptidasen *getrimmt*. Im Endosom gibt es zusätzlich das Enzym IRAP (PLAP), das Antigene für die Kreuzpräsentation spalten kann (aus Rock et al., 2010).

### 1.5 Interferenz von viralen Proteinen mit Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie

Damit eine virale Infektion ausheilt, ist eine starke CTL ( $CD8^+$ )-Antwort neben einer intakten  $CD4^+$ -T-Zell-Antwort während der akuten Phase der Infektion essentiell. In manchen Fällen, wie beim HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) und bei Hepatitis-C-Viren, muss die CTL-Antwort gegen viele CTL-Epitope gleichzeitig gerichtet sein. Jedoch verfügen beide Viren über verschiedenste Strategien, der Immunantwort zu entgehen (Bangham, 2009; Ishii und Koziel, 2008). Im Folgenden soll vor allem auf Interferenz-Mechanismen von viralen Proteinen mit Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie in infizierten Targetzellen eingegangen werden.

In diesem Zusammenhang ist beschrieben worden, dass insbesondere Proteine von Herpesviren, Adenoviren und Retroviren mit proteasomalen Komponenten, dem TAP-Transport bzw. der Expression und Präsentation von MHC-Molekülen interferieren (Lilley und Ploegh, 2005; Sijts et al., 2001). Beispielsweise inhibieren das *Immediate Early*



Genprodukt ICP47 des Herpesvirus (HSV) und verschiedene Proteine des *human cytomegalovirus* (HCMV) den Transport von *Precursor*-Peptiden durch TAP-Transporter in das ER-Lumen (Bauer und Tampe, 2002). Unterschiedliche Virus-Proteine, wie z.B. HIV-Nef, reduzieren die Menge an MHC-Molekülen auf der Oberfläche, indem sie diese in den Golgi-Apparat und Lysosomen re-translozieren (Blagoveshchenskaya et al., 2002). Interferenzen mit dem Proteasom-System sind z.B. für den viralen Transaktivator der Transkription HIV-Tat beschrieben, der an proteasomale alpha-Untereinheiten bindet und damit die proteasomale Interaktion mit PA28 inhibieren kann (Apcher et al., 2003; **Huang et al., 2002**; Seeger et al., 1997). Darüber hinaus beeinträchtigt intrazellulär vorliegendes Tat-Protein die Bildung von Immunoproteasomen, indem es die Transkription des  $\beta$ 1i/LMP2-Gens reprimiert und mit den Immununtereinheiten  $\beta$ 2i/MECL1 und  $\beta$ 5i/LMP7 interagiert (Remoli et al., 2006; Apcher et al., 2003).

Mutationen innerhalb von CTL-Epitopen (so genannte *escape*-Mutationen (Kimura et al., 2005; Ossendorp et al., 1996)) und in den Epitop-flankierenden Sequenzen können zu einem veränderten proteasomalen Schnittmuster führen. Dies ist beispielsweise für Epitope aus den HIV-Proteinen p17 und p24 sowie für Epitope des HIV-Nef (*human immunodeficiency virus-negative factor*)-Proteins bzw. des HCV-NS3 (*hepatitis C virus-nonstructural region 3*) Proteins gezeigt, die Mutationen in ihren flankierenden Sequenzen aufweisen (Tenzer et al., 2009; Milicic et al., 2005; **Seifert et al., 2004**).

Zusammengefasst verfügen Viren unter Ausnutzung der Gesamtheit ihrer Virusproteine über multiple Strategien, der  $CD8^+$  T-Zell-Immunantwort zu entgehen, indem sie die Präsentation viraler CTL-Epitope in Ziel-Zellen vermindern oder ganz verhindern.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 HIV-Tat interferiert mit der Aktivierung des 20S Proteasom-Komplexes durch den Proteasom-Aktivator PA28

Die proteasomale Prozessierung viraler Antigene und die anschließende Präsentation MHC-gebundener Epitope auf der Zelloberfläche stellt eine wichtige Voraussetzung für die CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunantwort dar. Viren haben jedoch verschiedene Strategien entwickelt, diese Immunantwort zu umgehen. *Immune escape* Mechanismen des HI-Virus, dem Erreger von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), gehören dabei zu den am besten charakterisierten. HIV-Tat ist als Transaktivator der Transkription in der Lage, die zelluläre Immunantwort gegen HIV auf unterschiedlichen Ebenen zu manipulieren (Gallo, 2002). Andererseits wurde in davon unabhängigen Untersuchungen demonstriert, dass gerade eine effiziente CTL-Antwort gegen Virusproteine, die früh während des viralen Replikationszyklus exprimiert werden, wie z.B. Tat, für die Virus-Eliminierung essentiell ist (Allen et al., 2000).

In unseren Analysen konnten wir einen weiteren *immune escape* Mechanismus des HIV-Tat-Proteins nachweisen. Durch vergleichende Strukturanalysen wurde eine übereinstimmende Region im Tat-Protein und in der Sequenz des Proteasom-Aktivators PA28 detektiert, die aus drei geladenen Aminosäureresten besteht und auf der Oberfläche beider Proteine liegt. Diese Region vermittelt die Bindung jeweils beider Proteine an 20S Proteasom-Komplexe. Wird diese Sequenz mutiert, fehlt die Aktivierung der Proteasom-Komplexe durch PA28 bzw. die Inhibition der Proteasom-Aktivität durch Tat. In weiterführenden Zell-Experimenten konnten wir bestätigen, dass diese Sequenz für die PA28-vermittelte verbesserte Epitop-Generierung verantwortlich ist. Als Modell-System wurden Zellen verwendet, die ein immundominantes Epitop des MCMV (*murine cytomegalovirus*) exprimieren, das von spezifischen CTLs erkannt wird und dessen proteasomale Generierung durch PA28 verstärkt wird (Groettrup et al., 1996). Diese Zielzellen exprimieren darüber hinaus konstitutiv den Proteasom-Aktivator PA28. Die Inkubation der Zellen mit der nicht-mutierten Tat-Sequenz ergab eine Suppression der CTL-Antwort gegen das pp89-Epitop. Dagegen waren Peptide mit mutierter Tat-Sequenz nicht mehr in der Lage, die Antigenpräsentation zu reduzieren (**Huang et al., 2002**).

Mit dem hier beschriebenen Mechanismus der reduzierten Epitop-Präsentation PA28-induzierbarer Epitope durch HIV-Tat zeigen wir eine weitere Möglichkeit des *immune escape* für HIV.

[J Mol Biol.](#) 2002 Nov 1;323(4):771-82.

**The RTP site shared by the HIV-1 Tat protein and the 11S regulator subunit alpha is crucial for their effects on proteasome function including antigen processing.**

[Huang X](#), [Seifert U](#), [Salzmann U](#), [Henklein P](#), [Preissner R](#), [Henke W](#), [Sijts AJ](#), [Kloetzel PM](#),  
[Dubiel W](#).

## 2.2 Die proteasomale Generierung des Hepatitis-C-NS3<sub>1073-1081</sub>-Epitops ist durch eine Mutation in der Epitop-flankierenden Sequenz beeinträchtigt

Für die Eliminierung von Hepatitis-C-Viren ist eine starke CTL-Antwort, die gegen viele Epitope gerichtet ist, essentiell. Untersuchungen an einer Gruppe von Patientinnen, die akzidentiell mit demselben Hepatitis-C-Strang bekannter Sequenz infiziert wurden, zeigten, dass die zelluläre Immunantwort gegen virale Epitope teilweise über Jahre persistiert, während HCV-spezifische Antikörper nicht mehr detektierbar sind (**Takaki et al., 2000**). Das Verschwinden von HCV-spezifischen Antikörpern und das Persistieren der T-Zell-Antwort indiziert, dass eine Infektion stattgefunden hat und diese durch eine effiziente zelluläre Immunantwort ausgeheilt ist. Insgesamt weist dies darauf hin, dass der Anteil der spontan ausheilenden Hepatitis-C-Infektionen in der Gesamtbevölkerung wahrscheinlich unterschätzt wird. Bei der detaillierten Analyse der CTL-Antwort gegen spezifische Epitope fiel auf, dass die Patienten-CTL-Antwort insbesondere gegen ein HLA-A2-restringiertes Epitop des HCV-NS3-Proteins gerichtet ist (HCV-NS3<sub>1073-1081</sub>, CVNGVCWTV) (**Takaki et al., 2000**). In weiterführenden Analysen zu diesem Epitop stellte sich heraus, dass Patientinnen mit chronisch persistierender Hepatitis-C-Infektion eine Mutation der Aminosäuresequenz direkt C-terminal vom Epitop aufweisen. Bei dieser Mutation handelt es sich um einen konservativen Tyrosin zu Phenylalanin Austausch, der in 71% der HLA-A2-positiven und 46% der HLA-A2-negativen Patientinnen zu finden ist aber nicht in Virusisolaten der Ausgangsquelle. Um zu analysieren, ob diese Mutation einen Einfluss auf die proteasomale Prozessierung ausübt, führten wir *in vitro* Prozessierungs-Experimente mit der Ausgangs-Peptidsequenz bzw. der mutierten Sequenz und aufgereinigten Proteasom-Komplexen durch. Die massenspektrometrische Analyse der generierten Peptidfragmente wies eine verringerte Epitop-Generierung aus Peptiden mit mutierter Sequenz im Vergleich zu Peptiden mit der Ausgangssequenz auf. Um zu demonstrieren, dass diese Mutation auch Auswirkungen auf die *in vivo* CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort hat, infizierten wir HLA-A2-transgene Mäuse (diese exprimieren zusätzlich zu den murinen MHC-Molekülen das humane HLA-A2-Molekül auf der Zelloberfläche) mit der Ausgangs- bzw. der mutierten HCV-NS3-Sequenz und analysierten anschließend die Induktion NS3-spezifischer CTL. Hierbei war zu sehen, dass die mutierte HCV-NS3-Sequenz zu einer verminderten Induktion Epitop-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (**Seifert et al., 2004**). Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass Mutationen in den Epitop-flankierenden Sequenzen zu einer verminderten proteasomalen Generierung und dadurch reduzierten Epitop-Erkennung durch CTL führen können.

[J Clin Invest.](#) 2004 Jul;114(2):250-9.

**Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing.**

[Seifert U](#), [Liermann H](#), [Racanelli V](#), [Halenius A](#), [Wiese M](#), [Wedemeyer H](#), [Ruppert T](#),  
[Rispeter K](#), [Henklein P](#), [Sijts A](#), [Hengel H](#), [Kloetzel PM](#), [Rehermann B](#).

### 2.3 Generierung des HIV-Nef<sub>73-82</sub> CTL-Epitops durch TPPII

Die überwiegende Mehrheit der MHC-Klasse-I-präsentierten Epitope wird proteasomal generiert. Im Gegensatz dazu hat sich die Präsentation einiger MHC-Klasse-I-Liganden (z.B. Epitope, die an HLA-A3- oder an HLA-A11-Moleküle binden) als insensitiv gegenüber Proteasom-Inhibition herausgestellt. Die Frage ist, inwieweit andere proteolytische Systeme proteasomale Funktionen übernehmen können. Aktivitäts-Analysen von zytosolischen Extrakten haben gezeigt, dass es im Zytosol keine nennenswerte Carboxypeptidase-Aktivität gibt. Proteasomen bestimmen in der Regel den C-terminalen Schnitt, während der N-terminale Schnitt variabel ist, so dass verschieden lange N-terminale *Precursor*-Peptide durch das Proteasom-System generiert werden (Craiu et al., 1997).

Im Rahmen unserer detaillierten Analysen zur Prozessierung eines HLA-A3-restringierten immundominanten Epitops des HIV-Nef-Proteins (HIV-Nef<sub>73-82</sub>) konnten wir TPPII als das alternative Enzym zur Epitop-Generierung detektieren. Initiale Experimente im Zellkultursystem, die unter Verwendung von Proteasom-Inhibitoren durchgeführt wurden, wiesen darauf hin, dass die Generierung des Nef<sub>73-82</sub>-Epitops Proteasom-unabhängig geschieht. Dies konnte in *in vitro* Prozessierungs-Experimenten mit Hilfe von aufgereinigten 20S bzw. 26S Proteasom-Komplexen bestätigt werden. Die massenspektrometrische Analyse der proteasomal generierten Schnittfragmente wies einen dominanten Schnitt nach dem Tyrosinrest Nef<sub>81</sub> im Epitop auf, der zur Zerstörung des C-terminalen Ankers für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle führt. Im Gegensatz dazu konnten wir in einem zellulären System, bei dem HIV-Nef durch Zielzellen präsentiert und die Epitop-Präsentation auf der Zelloberfläche durch Nef<sub>73-82</sub>-spezifische CTL nachgewiesen wird, zeigen, dass die Nef-Epitop-Generierung nach *knockdown* von TPPII mittels spezifischer siRNA verringert ist. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte die massenspektrometrische Analyse von *in vitro* Verdau-Experimenten mit aufgereinigter TPPII, dass TPPII nach dem Lysinrest K<sub>82</sub> schneidet und damit den korrekten C-Terminus des Nef-Epitops generiert. Dies stimmt mit der für TPPII beschriebenen Endopeptidase-Aktivität überein, präferentiell nach Lysinresten zu schneiden (Geier et al., 1999). Zusätzlich wurde durch den korrekten N-terminalen Schnitt nach P<sub>72</sub> das vollständige Epitop sowohl N- als auch C-terminal generiert (Seifert et al., 2003). Diese Befunde zeigen erstmalig, dass eine zytosolische Peptidase in der Lage ist, anstelle des Proteasoms ein Epitop durch korrekten C-terminalen Schnitt zu generieren. Dieses eher selten auftretende Ereignis gewinnt an Bedeutung, wenn Zellen durch Viren infiziert oder maligne entartet sind und dadurch proteasomale Funktionen eingeschränkt sind.

[Nat Immunol.](#) 2003 Apr;4(4):375-9. Epub 2003 Feb 24.

**An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope.**

[Seifert U](#), [Marañón C](#), [Shmueli A](#), [Desoutter JF](#), [Wesoloski L](#), [Janek K](#), [Henklein P](#), [Diescher S](#), [Andrieu M](#), [de la Salle H](#), [Weinschenk T](#), [Schild H](#), [Laderach D](#), [Galy A](#), [Haas G](#), [Kloetzel PM](#), [Reiss Y](#), [Hosmalin A](#).

## 2.4 Virus-induziertes Typ-I-Interferon stimuliert die Bildung von Immunoproteasomen und weiterer Bestandteile der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie (APM)

Viele Komponenten der APM werden in ihrer Aktivität durch IFN- $\gamma$  (Typ-II-Interferon), das von CTL und natürlichen Killerzellen im Rahmen einer viralen Infektion freigesetzt wird, reguliert. Dazu gehören die proteasomalen Untereinheiten  $\beta$ 1i/LMP2,  $\beta$ 2i/MECL1 und  $\beta$ 5i/LMP7, die die konstitutiven Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 im Rahmen einer Proteasom *de novo* Synthese ersetzen. Die generierten Immunoproteasomen unterscheiden sich von Standard-Proteasomen durch qualitative und quantitative Veränderungen ihrer proteolytischen Aktivität (Kloetzel, 2001; Strehl et al., 2005). Ebenfalls durch IFN- $\gamma$  werden der Proteasom-Aktivator PA28, die TAP-Transporter und MHC-Klasse-I-Moleküle, die zytosolische Aminopeptidase LAP (*leucine aminopeptidase*) und die ER-Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2 induziert. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde IFN- $\gamma$  als das vorwiegend an der Antigen-Prozessierung und -Präsentation beteiligte Zytokin determiniert. Da viele Viren im Wirtorganismus eine starke Typ-I-Interferon-Antwort induzieren, die deutlich früher als die Typ-II-vermittelte Immunantwort auftritt, haben wir den Einfluss von Typ-I-Interferon auf die Induktion von Immunoproteasomen und anderer APM-Komponenten analysiert.

Unsere initialen Untersuchungen zeigten, dass Typ-I-Interferone die Assemblierung und die proteolytische Aktivität von Immunoproteasomen in humanen Leberzellen stimulieren. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch auf virale (Hepatitis)-RNA übertragbar ist, analysierten wir die Wirkung von Poly(I:C), einem synthetischen Analogon für doppelsträngige RNA, sowie von HCV-RNA auf die Immunoproteasom-Bildung. Beide Mediatoren induzierten die Immunoproteasom-Assemblierung.

Da die Analyse der frühen Infektionsphase aufgrund der meist asymptomatischen Verläufe der Hepatitis C im humanen System kaum möglich ist, werden gezielte Untersuchungen zur Hepatitis-C-Infektion am Schimpansen durchgeführt, wobei sich meist eine milde Form der Hepatitis nach Virusinokulation ausbildet. Für die in diese Untersuchungen eingebundenen Schimpansen muss daher eine lebenslange Versorgung garantiert werden. Die Versuche wurden nach Richtlinien des NIH (*National Institutes of Health*) durchgeführt.

Interessanterweise zeigte sich in Leberbiopsie-Analysen von Schimpansen mit akuter Hepatitis-C-Infektion, dass die RNA der Proteasom-Immuno-untereinheiten mehrere Wochen vor der intrahepatischen IFN- $\gamma$ -Induktion ansteigt. Gleichzeitig mit der Induktion der Immuno-untereinheiten ist eine Stimulation der Typ-I-Antwort erkennbar, ersichtlich an der Erhöhung der Oligoadenylatcyclase, einem Marker für die Typ-I-IFN-Antwort.



Diese Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, dass IFN- $\gamma$  nicht der initiale Induktor von Immunoproteasomen während der viralen Infektion ist. Im Gegensatz dazu werden Immunoproteasomen in der frühen Infektionsphase durch Typ-I-Interferon in Hepatozyten induziert, so dass diese optimal vorbereitet sind, antigene Epitope zu prozessieren, noch bevor Effektor T-Lymphozyten die Leber infiltrieren (**Shin et al., 2006**).

Mittels synthetischer RNA bzw. Hepatitis-C-Virus-RNA konnten wir im zellulären System ebenfalls eine Induktion des Proteasom-Aktivators PA28, der zytosolischen Aminopeptidase LAP und der ER-Aminopeptidasen detektieren, die durch Blockierung der Typ-I-IFN-Wirkung aufgehoben werden konnte. Wie für die Immunoproteasom-Induktion beobachtet, ist in Leberbiopsien von Schimpansen mit akuter HCV-Infektion auch ein Anstieg der PA28- und der Aminopeptidase-mRNA gleichzeitig mit der Typ-I-IFN-Immunantwort detektierbar.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die virale Hepatitis-C-RNA während der frühen Infektionsphase die Expression verschiedener Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie in Zellen der Leber induziert, wobei dies durch eine intrahepatische Typ-I-Interferon-Antwort vermittelt wird, die mehrere Wochen vor der IFN- $\gamma$ -Induktion auftritt (**Shin et al., 2007**).

[J Clin Invest.](#) 2006 Nov;116(11):3006-14. Epub 2006 Oct 12.

**Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection.**

[Shin EC](#), [Seifert U](#), [Kato T](#), [Rice CM](#), [Feinstone SM](#), [Kloetzel PM](#), [Rehermann B](#).

[J Interferon Cytokine Res.](#) 2007 Dec;27(12):985-90.

**Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver.**

[Shin EC](#), [Seifert U](#), [Urban S](#), [Truong KT](#), [Feinstone SM](#), [Rice CM](#), [Kloetzel PM](#), [Rehermann B](#).

## 2.5 Immunoproteasomen erhalten das zelluläre Protein-Gleichgewicht bei IFN-induziertem oxidativen Stress

Bislang war die Rolle des Immunoproteasoms ausschließlich der Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden im Rahmen der adaptiven Immunantwort zugeordnet. Unsere kürzlich durchgeführten Untersuchungen im zellulären und im Maus-System zeigen jedoch, dass eine Hauptfunktion von Immunoproteasomen der Schutz der Zellen vor Interferon-induziertem oxidativen Stress ist. Bereits bekannt war, dass die Interferon-Ausschüttung im Rahmen einer viralen oder bakteriellen Infektion die Bildung von reaktiven Oxygen-Spezies (ROS) induziert, die dann zu einer oxidativen Schädigung insbesondere von neu synthetisierten Proteinen führt. Unsere Ergebnisse zeigen nun, dass es zeitgleich mit der Bildung von ROS zu einer transienten Akkumulation von oxidativ-geschädigten, polyubiquitinierten Proteinen kommt. Dies ist ein Zeichen, dass das Proteasom-System in dieser Situation nicht in der Lage ist, die ubiquitinierten Protein-Substrate in ausreichender Menge abzubauen. Erst mit der Induktion von Immunoproteasomen, ca. 8-12 Stunden nach IFN- $\gamma$ -Stimulation, werden die polyubiquitinierten Proteine vermehrt degradiert. Damit Immunoproteasomen neu gebildet werden können, muß der zelluläre Proteasom-Pool zuerst abgebaut werden. Dadurch kommt es zu einer passageren Abnahme der proteasomalen Aktivität und der beobachteten Ansammlung der ubiquitinierten Protein-Aggregate. Die vermehrte Bildung polyubiquitinerter Proteine wird darüber hinaus durch eine Aktivierung des Ubiquitin-Systems und durch eine gesteigerte Protein-Synthese infolge erhöhter Translation unter IFN- $\gamma$  Bedingungen vermittelt. Besonders deutlich sichtbar wird die Ansammlung der Aggregate in Immunoproteasom-defizienten Zellen, wobei es dort zu keinem wesentlichen Abbau der polyubiquitinierten Proteine im weiteren Zeitverlauf kommt. In diesen Zellen findet sich infolge der Toxizität der kontinuierlich vorhandenen Aggregate eine gesteigerte Apoptose. Damit sind Immunoproteasomen essentiell für die Aufrechterhaltung des Proteingleichgewichtes im entzündungsexponierten Gewebe. Dieser protektive Effekt wird auch in einem Mausmodell für multiple Sklerose deutlich, in dem das Fehlen von Immunoproteasomen zu einem schlechteren Krankheitsverlauf mit der Ablagerung von Proteinaggregaten in neuronalen Zellen führt. Unsere Daten zeigen damit erstmals, dass die Hauptfunktion von Immunoproteasomen im zellulären Schutz bei IFN-induziertem oxidativen Stress liegt. Durch den gesteigerten Substratumsatz durch Immunoproteasomen werden gleichzeitig auch vermehrt MHC-Klasse-I-Liganden gebildet, wobei so die zelluläre Immunanpassung im Rahmen einer Infektion gewährleistet wird (Seifert et al., 2010).

[Cell](#). 2010 Aug 20;142(4):613-24.

**Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress.**

[Seifert U](#), [Bialy LP](#), [Ebstein F](#), [Bech-Otschir D](#), [Voigt A](#), [Schröter F](#), [Prozorovski T](#), [Lange N](#), [Steffen J](#), [Rieger M](#), [Kuckelkorn U](#), [Aktas O](#), [Kloetzel PM](#), [Krüger E](#).

### 3. Übergreifende Diskussion und Ausblick

Die aktive Bekämpfung von intrazellulär vorliegenden viralen bzw. bakteriellen Erregern seitens des Immunsystems erfordert eine wirksame CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Erkennung und Zerstörung von infizierten Zielzellen. Dabei basiert die Effektivität der CTL-Antwort im Wesentlichen auf der Interaktion zwischen CTLs und infizierten Zellen, die wiederum von der Quantität und Qualität spezifischer MHC-Klasse-I-Epitop-Komplexe abhängt. Infizierte Zellen können multiple Mechanismen entwickeln, sich der CTL-Erkennung zu entziehen, indem sie die Aktivität und Vitalität von CTL beeinflussen und/oder die Präsentation von MHC-Klasse-I-restringierten Epitopen auf ihren Zelloberflächen durch Interferenz mit Komponenten der APM verändern (Keller, 2009).

In unseren Arbeiten haben wir unterschiedliche Mechanismen der Virus-Interferenz mit der Antigen-Prozessierung aufdecken und charakterisieren können. Beispielsweise interferiert der virale Transaktivator der Transkription HIV-Tat mit der Bindung des Proteasomaktivators PA28 an den 20S Proteasom-Kern-Komplex (Huang et al., 2002). Verschiedene Prozessierungsanalysen am Beispiel von Virus- und Selbstantigenen haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die Anlagerung von PA28 an den Proteasom-Komplex zu einer verbesserten MHC-Klasse-I-Epitop-Generierung führt (Sijts et al., 2002). Für die Generierung des Tumorepitops TRP2<sub>360-368</sub> (*tyrosinase related protein*) ist PA28 sogar essentiell (Sun et al., 2002). Die Interferenz mit der Bindung von PA28 an Proteasomen kann daher zu einer beeinträchtigten Generierung von einer Reihe von Epitopen führen. Andererseits hat sich gezeigt, dass einige Epitope in ihrer Generierung nicht durch PA28 beeinflusst werden und teilweise auch abhängig vom exprimierten HLA-Allel zerstört werden (Yamano et al., 2008). Basierend auf dem derzeitigen Erkenntnisstand kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, wie groß der Anteil der Epitope ist, die ohne Beteiligung von PA28 generiert werden. Indem HIV-Tat nicht nur an verschiedene proteasomale Untereinheiten bindet (Apcher et al., 2003), sondern auch die Assoziation von PA28 und Proteasomen inhibiert, erweitert sich das Spektrum der CTL-Epitope, die bei einer HIV-Infektion beeinträchtigt oder gar nicht generiert werden. Dieser Mechanismus ist funktionell entscheidend, da PA28 im Normalfall bei einer Infektion durch IFN- $\gamma$  stimuliert wird und vermehrt an Proteasomen bindet, hier aber durch die Interferenz von HIV-Tat seine Aktivität nicht entfalten kann.

Eine andere Möglichkeit von Viren, sich der CTL-Antwort zu entziehen, besteht in der Selektion von mutierten Epitop-Sequenzen, die nicht mehr von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden bzw. nicht mehr an MHC-Moleküle binden oder vermindert durch Proteasomen

prozessiert werden (Kimura et al., 2005). Das Auftreten dieser mutierten Sequenzen, die als *immune escape* Varianten bezeichnet werden, ist insbesondere für RNA-Viren wie HIV und HCV beschrieben worden (Barouch und Letvin, 2002). Hierbei können Mutationen, die innerhalb von CTL-Epitopen liegen (Kimura et al., 2005; Ossendorp et al., 1996) und auch Mutationen, die C-terminal des eigentlichen Epitops auftreten, zu einem veränderten proteasomalen Schnittmuster führen (Beekman et al., 2000; Milicic et al., 2005). Jedoch ist es insgesamt schwierig die Relevanz solcher Mutationen auf den Infektionsverlauf und die Häufigkeit des Auftretens einzelner Mutationen einzuschätzen, da meist Proben verschiedener Patienten mit variierenden Krankheitsverläufen und unterschiedlicher Ausgangssequenz untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals den Verlauf und das Auftreten von Mutationen in einem Patientenkollektiv nach akzidentieller Hepatitis-C-Infektion im Vergleich zur Ausgangssequenz analysieren, die Mutation mit der größten Abundanz weiterverfolgen sowie deren Einfluss auf die proteasomale Generierung *in vitro* und *in vivo* darstellen (Seifert et al., 2004; Takaki et al., 2000). Kürzlich publizierte Untersuchungen zur HIV-Epitop-Generierung zeigen darüber hinaus, dass nicht nur das proteasomale Schnittverhalten entscheidend für die Ausbildung der CTL-Epitop-Hierarchie ist, sondern auch die Bindung der viralen Sequenz an TAP-Transporter bzw. das *Trimmen* der Vorläufer-Peptide durch die ER-Aminopeptidase 1 (Tenzer et al., 2009).

In Ausnahmefällen können alternativ zum Proteasom andere Enzym-Systeme die Epitop-Generierung übernehmen. Dies konnten wir in unseren Arbeiten erstmals am Beispiel eines immundominanten CTL-Epitops des HIV-Nef-Proteins zeigen (Seifert et al., 2003). Die Wichtigkeit unserer Daten wurde in einem Kommentar der Arbeitsgruppe eines der führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der Antigen-Prozessierung, Prof. J. Neefjes (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande), herausgestellt (Herberts et al., 2003). Dieser Mechanismus ist insbesondere von Bedeutung bei Substraten, die nicht oder nur sehr verzögert vom Proteasom-System degradiert werden oder entscheidend in Situationen, in denen die proteasomale Aktivität beeinträchtigt ist, wie z.B. bei einer viralen Infektion oder der malignen Entartung von Zellen. Eine Inhibition von TPPII durch Virusproteine ließ sich dagegen bislang nicht nachweisen. Darüber hinaus zeigt sich bei der Analyse von Tumorzellen sogar eine gesteigerte TPPII-Aktivität und eine veränderte Spezifität der intrazellulären Proteolyse (Hong et al., 2003). Das HIV-Nef<sub>73-82</sub>-Epitop wird sowohl am N- als auch am C-Terminus durch TPPII und unabhängig vom Proteasom-System geschnitten. Dies ist eine Besonderheit und ist wahrscheinlich in der Epitop-Sequenz und in der das Epitop flankierenden Sequenz begründet. Neben der Aminopeptidase-Aktivität von TPPII,

sequentiell Tripeptide vom N-Terminus längerer Vorläuferpeptide abzuspalten, besitzt TPPII eine gering ausgeprägte Endopeptidase-Aktivität mit einer Schnitt-Präferenz nach Lysin (K)- und Arginin (R)-Resten (Geier et al., 1999). Prolin-Reste wirken sich dagegen negativ auf die Exopeptidase-Aktivität von TPPII aus (Tomkinson and Lindas, 2005). Betrachtet man die Nef-Epitop-Sequenz und die sich N-terminal anschließenden Aminosäurereste genauer, fällt das gehäufte Auftreten von Prolinresten auf. Es ist daher denkbar, dass bei der Prozessierung des Nef-Epitops die N-terminale *trimming* Aktivität von TPPII durch Prolin gestoppt wird und das Epitop durch die normalerweise gering vorhandene Endopeptidase-Aktivität, die jetzt „übernimmt“, durch einen Schnitt nach dem C-terminalen Lysin-Rest generiert wird. Zusätzlich können die Prolinreste innerhalb des Epitops (QVPLRPMTYK) ein Schneiden durch die Exopeptidase-Aktivität verhindern, so dass das Nef-Epitop nicht durch TPPII zerstört wird. Interessanterweise befindet sich in der Sequenz C-terminal vom HIV-Nef<sub>73-82</sub>-Epitop ein weiteres mögliches CTL-Epitop mit einer Bindungsaffinität für HLA-A3/-A11-MHC-Moleküle (Nef<sub>86-94</sub>, DLSHFLKEK). Bei der Analyse der durch TPPII generierten Spaltfragmente ergab sich jedoch keine Generierung dieses Epitops. Dies könnte zum einen daran liegen, dass hier keine Prolinreste vorhanden sind, die die Exopeptidase-Aktivität inhibieren, zum anderen, dass ein Schnitt nach dem Lysin-Rest im Epitop zur Degradation dieses potentiellen Epitops führt. Vergleicht man die Sequenz und das Schnittmuster beim HIV-Nef<sub>73-82</sub>-Epitop mit anderen CTL-Epitopen, die in ihrer Generierung durch TPPII positiv bzw. negativ oder gar nicht beeinflusst werden, ist eine solche Verteilung von Prolin- und Lysin-Resten nicht zu finden (Diekmann et al., 2009; Grauling-Halama et al., 2009; Guil et al., 2006; Levy et al., 2002; Schnurr et al., 2009; Preta et al., 2008; Basler und Groettrup, 2007). Obwohl der Einfluss von TPPII auf die Prozessierung unterschiedlicher CTL-Epitope nachgewiesen wurde, konnte der Abbau ganzer ubiquitiniertes Proteine durch TPPII bislang nicht gezeigt werden. In Übereinstimmung damit zeigen kürzlich publizierte Daten, dass Zellen, die mit dem TPPII-Inhibitor AAF-CMK (*Ala-Ala-Phe-chloromethylketone*) behandelt wurden, zwar Ansammlungen von polyubiquitinierten Proteinen aufweisen, diese jedoch nicht durch die fehlende TPPII-Aktivität begründet sind (Villasevil et al., 2010).

Mittlerweile sind weitere Peptidasen identifiziert worden, die in der Lage sind, den C-terminalen Schnitt von Epitopen zu generieren. Beispielsweise wurde für ein HLA-A1-restringiertes Epitop des Tumorantigens MAGE-A3 gezeigt, dass die zytosolisch lokalisierte Metallopeptidase *insulin degrading enzyme* (IDE) für die Epitop-Generierung verantwortlich ist. Interessanterweise resultiert eine Inhibition von IDE in einem verminderten MAGE-A3 Protein-Abbau. Diese Beobachtung spricht für die Aktivität eines zytosolisch lokalisierten

proteolytischen Systems, das parallel zum Proteasom-System agieren kann (Parmentier et al., 2010). Unsere weiterführenden Analysen zur Epitop-Prozessierung eines HLA-A3-restringierten Epitops des Tumorantigens PRAME (PRAME<sub>190-198</sub>) zeigen die Beteiligung von *Nardilysin* in Kombination mit *thimet oligopeptidase* an der Epitop-Generierung (Kessler, Khan, Seifert et al., in Vorbereitung). Zusammengefasst ist eine Proteasom-unabhängige Epitop-Generierung durch unterschiedliche Enzym-Systeme möglich, entspricht jedoch nicht dem Regelfall.

Einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung des Proteasom-Systems unter Infektions- und Entzündungs-Bedingungen leisten unsere im Hepatitis-C-Infektionsmodell im Schimpansen erhobenen Daten. Immunoproteasomen werden im Rahmen der frühen Immunantwort (bis zu acht Wochen nach Infektion) in der Leber gebildet, wobei dies durch die Freisetzung von Typ-I-IFN als Reaktion auf eine Hepatitis-C-Infektion geschieht (Shin et al., 2006). Diese frühe Induktion des Immunoproteasoms verschafft dabei dem Wirtsorganismus bei der Virus-Eliminierung einen Vorteil. Die infizierten Zielzellen sind bereits zum Zeitpunkt der CTL-Rekrutierung in das Gewebe in der Lage, genügend MHC-Klasse-I-Epitope auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. IFN- $\gamma$ , das bislang als das wichtigste Zytokin zur Prozessierung viraler Epitope angesehen wurde, wird erst im späteren Verlauf der Infektion gebildet und ist ca. zwölf bis sechzehn Wochen post infectionem in der Leber nachweisbar. Dieser Mechanismus der frühzeitigen Induktion von Immunoproteasomen durch Typ-I-IFN könnte auch die große Wirksamkeit von Typ-I-IFN-Therapien erklären, insbesondere, wenn diese in der Anfangsphase der Hepatitis-Infektion appliziert werden. Der protektive Effekt einer frühzeitigen Induktion von Immunoproteasomen durch Typ-I-IFN im Herzmuskel macht sich auch bei einer Infektion mit Coxsackie-Viren (CVB3) bemerkbar. Die früh-aufretende Immunoproteasom-Aktivität im Verlauf der Infektion zieht eine weniger ausgeprägte Myokarditis nach sich (Jäkel et al., 2009). Andererseits ist der Typ-I-IFN-vermittelte Effekt nicht auf alle Virusinfektionen übertragbar. Bei einer Infektion im Maus-System mit *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) ist IFN- $\gamma$  der Hauptstimulus für die Bildung von Immunoproteasomen und Proteasomaktivator PA28 (Khan et al., 2001). Eine Erklärung dafür könnte die verminderte Produktion von Typ-I-IFN während der LCMV-Infektion sein (Lee et al., 2009).

Im Rahmen einer Immunantwort sind nicht nur Immunoproteasomen für die effiziente Generierung viraler oder bakterieller Epitope entscheidend. Wichtig ist auch die Interferon-induzierte Aktivierung von Aminopeptidasen im Zytosol und ER-Kompartiment. Diese *trimmen* proteasomale Peptidprodukte auf die richtige Länge, damit sie direkt an neu



synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle binden können. Sie sorgen damit für eine schnellere Verfügbarkeit von Epitopen mit optimaler Länge. Für die Aminopeptidasen LAP, ERAP1 und ERAP2 wurde bereits eine IFN- $\gamma$ -abhängige Stimulierung gezeigt. Im Virus-Modell zeigte sich nun, dass diese Aminopeptidasen auch durch Typ-I-IFN induzierbar sind (**Shin et al., 2007**). Durch den Effekt von Typ-I-IFN auf verschiedene Komponenten der APM wird eine effiziente Epitop-Generierung während der akuten Virus-Infektion ermöglicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse schien es von großem Interesse zu sein, die frühe Reaktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems auf eine Infektion bzw. Entzündung genauer zu analysieren. Unsere Daten zeigen, dass proinflammatorische Zytokine im zellulären System und auch im Maus-System nicht nur die Expression proteasomaler Komponenten und einer Reihe von ubiquitinierenden E2/E3 Enzymen induzieren, sondern auch die vermehrte Neu-Synthese von Proteinen. Diese neu gebildeten Proteine sind insbesondere anfällig gegenüber einer oxidativen Schädigung durch Sauerstoffradikale, die ebenfalls infolge von IFN-Stimulation gebildet werden. Solche geschädigten Proteine, auch DRiPs (*defective ribosomal products*) genannt, weisen eine fehlerhafte Proteinfaltung auf. Zellen oder Gewebe, denen ein funktionstüchtiges Immunoproteasom fehlt, können diese oxidativ geschädigten Proteine (*aggresome-like induced structures* = ALIS) nur in geringem Maße abbauen. Die toxische Wirkung dieser Aggregate auf das zelluläre Gleichgewicht manifestiert sich beispielsweise in einem schlechteren Verlauf einer Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE). In einem weiteren Maus-Entzündungs-Modell, einer durch Lipopolysaccharid (einer Komponente der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien) induzierten Entzündung, findet sich eine vermehrte Ansammlung von oxidativ-geschädigten und auch ubiquitinierten Proteinen in der Leber (**Seifert et al., 2010**). Der Neuigkeitswert und die Bedeutung unserer Daten, eine Funktion für das Immunoproteasom zu definieren, wurde auch hier in einem Kommentar von Prof. J. Neefjes und Dr. S. Van Deventer gewürdigt (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande (Van Deventer und Neefjes, 2010)). Vergleicht man die Reaktion von professionell Antigenpräsentierenden Zellen (z.B. DCs) mit der von infizierten Zielzellen auf inflammatorischen Stress, fällt in DCs eine ähnliche Ansammlung von ubiquitinierten Protein-Aggregaten während der Maturierung auf (Fassbender et al., 2008; Herter et al., 2005). Diese Aggregate werden als *DC aggresome-like induced structures* (DALIS) bezeichnet und können als eine Art regulierendes Kompartiment angesehen werden, in dem ubiquitinierte Proteine von Pathogenen angesammelt und bei Bedarf auch freigesetzt werden (Herter et al., 2005; Lelouard et al., 2004). Jedoch sind DCs vor den toxischen Einflüssen der Aggregate durch ihre durchgehend hohe Expression und

Aktivität von Immunoproteasomen weitgehend geschützt. Ubiquitinierte Proteine können aus Aggresomen freigesetzt und anschließend über das Proteasom-System zu MHC-Klasse-I-Liganden bzw. *Precursor*-Peptiden abgebaut werden. Die im Verlauf der Infektion früh einsetzende Epitop-Präsentation ist dabei eine entscheidende Voraussetzung, eine effiziente CTL-Antwort gegen Pathogen-Antigene zu induzieren (Deol et al., 2007). In infizierten Targetzellen findet gleichzeitig mit der Assemblierung von Immunoproteasomen ein verstärkter Protein-Abbau und damit eine deutlich erhöhte Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden statt (Warnatsch, Seifert und Krüger, in Vorbereitung). Dies erklärt auch die verbesserte Antigen-Präsentation unter Infektionsbedingungen und die verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen in  $\beta 5i$ /LMP7-defizienten Mäusen (Fehling et al., 1994). Noch weitgehend unbekannt ist dagegen die Vielfalt der immunregulatorischen Funktionen, die von einzelnen Immununtereinheiten bzw. Immunoproteasomen beeinflusst werden können. Sicher ist nur, dass Immunoproteasomen wichtige Aufgaben erfüllen, die jenseits der Generierung von MHC-Klasse-I-Epitopen liegen. Kürzlich publizierte Untersuchungen an  $\beta 1i$ /LMP2-defizienten Mäusen zeigen in diesem Zusammenhang, dass die Funktion von B-Zellen, die T-Helferzell-Aktivität und auch die Zytokin-Sekretion von DCs in diesen Mäusen beeinträchtigt ist (Hensley et al., 2010). Vergleicht man den Verlauf verschiedener Krankheits- bzw. Infektionsmodelle in Immunoproteasom-defizienten Mäusen, gibt es Unterschiede je nach Modell. Während die Pathogen-*Clearance* und der Infektionsverlauf in  $\beta 5i$ /LMP7-defizienten Mäusen nach Listerien- bzw. Toxoplasmen-Infektion beeinträchtigt ist, verläuft eine experimentelle Colitis bei Fehlen von  $\beta 5i$ /LMP7 deutlich besser (Strehl et al., 2006; Tu et al., 2009; Basler et al., 2010; Schmidt et al., 2010). In unseren eigenen Untersuchungen war ein schlechterer Krankheitsverlauf in  $\beta 5i$ /LMP7-defizienten Mäusen nach Induktion einer EAE zu beobachten (**Seifert et al., 2010**). Der andersartige Verlauf könnte dabei auf die Aktivierung eines unterschiedlichen Zytokinmusters zurückzuführen sein. Schmidt et al. finden beispielsweise, dass der mildere Verlauf der Colitis durch reduzierte Level des Entzündungsmediators NF-kappaB in  $\beta 5i$ /LMP7-defizienten Mäusen begründet ist (Schmidt et al., 2010). Diese Beobachtung kann durch unsere Analysen unterstützt werden, in denen wir einen reduzierten Abbau des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  und damit eine verminderte Aktivierung von NF-kappaB in Zellen mit Standard-Proteasomen finden (**Seifert et al., 2010**). Analysen in Mäusen, denen alle drei Immununtereinheiten fehlen, werden hilfreich sein, die Rolle und die Funktion des Immunoproteasoms besser verstehen zu können. In weiterführenden Projekten werden wir gezielt die Auswirkungen verschiedener Pathogene, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* und Influenza-A-Virus, auf das Ubiquitin-Proteasom-

System untersuchen. Erste Hinweise zeigen, dass auch in Pneumokokken- bzw. Influenza-Virus-infizierten Zellen eine transiente Akkumulation oxidativ geschädigter ubiquitinerter Proteine stattfindet. Wir werden diese Ergebnisse mit denen, die wir in Immunproteasom-defizienten Mäusen erhalten, vergleichen. Das Verständnis der Interaktion von Pathogenen mit dem Ubiquitin-Proteasom-System und *vice versa* ist eine entscheidende Voraussetzung zur Etablierung therapeutischer Ansätze, in denen Proteasom-spezifische und Immununtereinheiten-spezifische Inhibitoren, die bereits in der Therapie des Multiplen Myeloms etabliert sind, zum Einsatz kommen können.

## 4. Zusammenfassung

Die MHC-Klasse-I-vermittelte Epitop-Präsentation stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Eliminierung infizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) dar. Zur Generierung von Epitopen mit korrekter Bindungslänge für MHC-Moleküle müssen jedoch zunächst ubiquitinierte Proteine intrazellulär in einem mehrere Schritte umfassenden Degradationsprozess abgebaut werden. In diesem Zusammenhang ist das Proteasom-System als das zentrale Proteolysesystem definiert worden, das korrekte Epitope aber vor allem auch N-terminal verlängerte *Precursor*-Peptide generiert. Diese werden im Zytosol oder im ER-Kompartiment durch Aminopeptidasen weiter *getrimmt*.

Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, der Immunantwort zu entgehen. Beispielsweise interferiert das HIV-Tat-Protein mit der Aktivierung des Proteasom-Komplexes durch den Proteasomaktivator PA28. Dies hat zur Folge, dass die verbesserte Präsentation von PA28-stimulierbaren Epitopen verhindert wird. Ein anderer *immune escape* Mechanismus ist für ein immundominantes Epitop des HCV-NS3-Proteins detektierbar. In der Virussequenz chronisch erkrankter Patientinnen ist eine Mutation nachweisbar, die direkt C-terminal vom eigentlichen Epitop auftritt. Diese Mutation hat zur Folge, dass Proteasomen *in vitro* das entsprechende Epitop vermindert generieren und dass *in vivo* eine geringere CTL-Antwort gegen dieses Epitop induziert wird. Bei eingeschränkter Funktion des Proteasom-Systems können andere proteolytische Systeme einen Teil proteasomaler Funktionen kompensieren. Dies trifft beispielsweise für die Generierung eines immundominanten HLA-A3-restringierten Epitops des HIV-Nef-Proteins zu, das durch das Enzym Tripeptidyl Peptidase II generiert wird, wobei für den C-terminalen Schnitt des Epitops die gering ausgeprägte Endopeptidase-Aktivität des Enzyms genutzt wird.

Die Grundlage für eine verbesserte Viruseliminierung stellt auf der anderen Seite die Typ-I-Interferon-vermittelte Induktion von Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie während der frühen Immunantwort dar. Die frühzeitige Stimulierung von Immunoproteasomen, PA28 sowie der Aminopeptidasen LAP, ERAP1 und ERAP2 als Reaktion auf eine Hepatitis-C-Virus-Infektion bereitet dabei die infizierte Zielzelle auf eine optimale Präsentation viraler Epitope vor, noch bevor zytotoxische T-Zellen am Infektionsort rekrutiert werden. Immunoproteasomen besitzen darüber hinaus wichtige Funktionen im Rahmen der angeborenen Immunität, indem sie oxidativ geschädigte Proteine im entzündungsexponierten Gewebe verstärkt abbauen und damit das zelluläre Protein-Gleichgewicht wieder herstellen. Der erhöhte Substratumsatz durch Immunoproteasomen

gewährleistet dabei auch eine verstärkte Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden sowie deren Präsentation gegenüber spezifischen T-Lymphozyten.

Zusammengefasst gibt es zahlreiche Möglichkeiten der Pathogen-Interferenz mit Protein- bzw. Peptid-abbauenden Komponenten der Antigen-Prozessierungs-Maschinerie und damit auch mit der Effizienz der zellulären Immunantwort. Die Kenntnis dieser Mechanismen bildet eine Grundlage für therapeutische Ansätze, die zu einer effizienten Pathogen-Eliminierung beitragen können.

## 5. Literaturverzeichnis

Ahn, J.Y., Tanahashi, N., Akiyama, K., Hisamatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C.H., Shibmara, N., Willy, P.J., Mott, J.D., *et al.* (1995). Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 366, 37-42.

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

Allen, T.M., O'Connor, D.H., Jing, P., Dzuris, J.L., Mothe, B.R., Vogel, T.U., Dunphy, E., Liebl, M.E., Emerson, C., Wilson, N., *et al.* (2000). Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407, 386-390.

Apcher, G.S., Heink, S., Zantopf, D., Kloetzel, P.M., Schmid, H.P., Mayer, R.J., and Krüger, E. (2003). Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits. *FEBS Lett* 553, 200-204.

Balów, R.M., Tomkinson, B., Ragnarsson, U., and Zetterqvist, O. (1986). Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J Biol Chem* 261, 2409-2417.

Bangham, C.R. (2009). CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol* 39, 1700-1712.

Barouch, D.H., and Letvin, N.L. (2002). Viral evolution and challenges in the development of HIV vaccines. *Vaccine* 20 Suppl 4, A66-68.

Basler, M., Dajee, M., Moll, C., Groettrup, M., and Kirk, C.J. (2010). Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J Immunol* 185, 634-641.

Basler, M., and Groettrup, M. (2007). No essential role for tripeptidyl peptidase II for the processing of LCMV-derived T cell epitopes. *Eur J Immunol* 37, 896-904.

Bauer, D., and Tampe, R. (2002). Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP--from genes to function and structure. *Curr Top Microbiol Immunol* 269, 87-99.

Beekman, N.J., van Veelen, P.A., van Hall, T., Neisig, A., Sijts, A., Camps, M., Kloetzel, P.M., Neefjes, J.J., Melief, C.J., and Ossendorp, F. (2000). Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. *J Immunol* 164, 1898-1905.

Beninga, J., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-18742.

Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Feliciangeli, S.F., Hung, C.H., and Thomas, G. (2002). HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 111, 853-866.

Blanchard, N., Kanaseki, T., Escobar, H., Delebecque, F., Nagarajan, N.A., Reyes-Vargas, E., Crockett, D.K., Raulet, D.H., Delgado, J.C., and Shastri, N. (2010). Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J Immunol* 184, 3033-3042.

Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179, 901-909.

Chapatte, L., Ayyoub, M., Morel, S., Peitrequin, A.L., Levy, N., Servis, C., Van den Eynde, B.J., Valmori, D., and Levy, F. (2006). Processing of tumor-associated antigen by the proteasomes of dendritic cells controls in vivo T-cell responses. *Cancer Res* 66, 5461-5468.

Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J.E., Morel, S., Burllet-Schiltz, O., Monsarrat, B., *et al.* (2006). Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol* 176, 1053-1061.

Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2001). Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp Med* 193, 1319-1326.

Chuang, C.K., Rockel, B., Seyit, G., Walian, P.J., Schonegge, A.M., Peters, J., Zwart, P.H., Baumeister, W., Jap, B.K. (2010). Hybrid molecular structure of the giant protease tripeptidyl peptidase II. *Nat Struct Mol Biol* 17, 990-996.

Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87.

Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.

Craiu, A., Akopian, T., Goldberg, A., and Rock, K.L. (1997). Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10850-10855.

Dahlmann, B. (2005). Proteasomes. *Essays Biochem* 41, 31-48.

Dahlmann, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., and Kuehn, L. (2001). Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* 83, 295-299.

Dahlmann, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S., and Kloetzel, P.M. (2000). Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* 303, 643-653.

Deol, P., Zaiss, D.M., Monaco, J.J., Sijts, A.J. (2007). Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J Immunol* 178, 7557-7562.

Diekmann, J., Adamopoulou, E., Beck, O., Rauser, G., Lurati, S., Tenzer, S., Einsele, H., Rammensee, H.G., Schild, H., and Topp, M.S. (2009). Processing of two latent membrane protein 1 MHC class I epitopes requires tripeptidyl peptidase II involvement. *J Immunol* 183, 1587-1597.

Ebstein, F., Lange, N., Urban, S., Seifert, U., Krüger, E., and Kloetzel, P.M. (2009). Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1205-1215.

Fassbender, M., Herter, S., Holtappels, R., and Schild, H. (2008). Correlation of dendritic cell maturation and the formation of aggregates of poly-ubiquitinated proteins in the cytosol. *Med Microbiol Immunol* 197, 185-189.

Fehling, H.J., Swat, W., Laplace, C., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, U., and von Boehmer, H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265, 1234-1237.

Firat, E., Huai, J., Saveanu, L., Gaedicke, S., Aichele, P., Eichmann, K., van Endert, P., and Niedermann, G. (2007a). Analysis of direct and cross-presentation of antigens in TPPII knockout mice. *J Immunol* 179, 8137-8145.

Firat, E., Saveanu, L., Aichele, P., Staeheli, P., Huai, J., Gaedicke, S., Nil, A., Besin, G., Kanzler, B., van Endert, P., *et al.* (2007b). The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* 178, 2241-2248.

Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., and Kloetzel, P.M. (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* 236, 975-981.

Fruci, D., Ferracuti, S., Limongi, M.Z., Cunsolo, V., Giorda, E., Fraioli, R., Sibilio, L., Carroll, O., Hattori, A., van Endert, P.M., *et al.* (2006). Expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases in EBV-B cell lines from healthy donors and in leukemia/lymphoma, carcinoma, and melanoma cell lines. *J Immunol* 176, 4869-4879.

Gallo, R.C. (2002). Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. *Immunol Rev* 185, 236-265.

Gavioli, R., Frisan, T., Vertuani, S., Bornkamm, G.W., and Masucci, M.G. (2001). C-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells. *Nat Cell Biol* 3, 283-288.

Georgiadou, D., Hearn, A., Evnouchidou, I., Chroni, A., Leondiadis, L., York, I.A., Rock, K.L., Stratikos, E. (2010). Placental leucine aminopeptidase efficiently generates mature antigenic peptides in vitro but in patterns distinct from endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *J Immunol* 185, 1584-1592.

Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283, 978-981.



Glickman, M.H., and Maytal, V. (2002). Regulating the 26S proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol* 268, 43-72.

Goldberg, A.L., and Dice, J.F. (1974). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu Rev Biochem* 43, 835-869.

Grauling-Halama, S., Bahr, U., Schenk, S., and Geginat, G. (2009). Role of tripeptidyl peptidase II in the processing of *Listeria monocytogenes*-derived MHC class I-presented antigenic peptides. *Microbes Infect* 11, 795-802.

Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-168.

Groettrup, M., Standera, S., Stohwasser, R., and Kloetzel, P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8970-8975.

Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.

Guil, S., Rodriguez-Castro, M., Aguilar, F., Villasevil, E.M., Anton, L.C., and Del Val, M. (2006). Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J Biol Chem* 281, 39925-39934.

Hammer, G.E., Gonzalez, F., James, E., Nolla, H., and Shastri, N. (2007). In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat Immunol* 8, 101-108.

Haroon, N., and Inman, R.D. (2010). Endoplasmic reticulum aminopeptidases: Biology and pathogenic potential. *Nat Rev Rheumatol* 6, 461-467.

Hearn, A., York, I.A., and Rock, K.L. (2009). The specificity of trimming of MHC class I-presented peptides in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 183, 5526-5536.

Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.

Hensley, S.E., Zanker, D., Dolan, B.P., David, A., Hickman, H.D., Embry, A.C., Skon, C.N., Grebe, K.M., Griffin, T.A., Chen, W., *et al.* (2010). Unexpected Role for the Immunoproteasome Subunit LMP2 in Antiviral Humoral and Innate Immune Responses. *J Immunol*. 184, 4115-4122.

Herberts, C., Reits, E., and Neefjes, J. (2003). Proteases, proteases and proteases for presentation. *Nat Immunol* 4, 306-308.

Herter, S., Osterloh, P., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Hohfeld, J., Rammensee, H.G., and Schild, H. (2005). Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *J Immunol* 175, 891-898.

Hong, X., Lei, L., and Glas, R. (2003). Tumors acquire inhibitor of apoptosis protein (IAP)-mediated apoptosis resistance through altered specificity of cytosolic proteolysis. *J Exp Med* 197, 1731-1743.

Hong, X., Lei, L., Kunert, B., Naredla, R., Applequist, S.E., Grandien, A., and Glas, R. (2007). Tripeptidyl-peptidase II controls DNA damage responses and in vivo gamma-irradiation resistance of tumors. *Cancer Res* 67, 7165-7174.

Huai, J., Firat, E., Nil, A., Million, D., Gaedicke, S., Kanzler, B., Freudenberg, M., van Endert, P., Kohler, G., Pahl, H.L., *et al.* (2008). Activation of cellular death programs associated with immunosenescence-like phenotype in TPPII knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5177-5182.

Huang, X., Seifert, U., Salzmann, U., Henklein, P., Preissner, R., Henke, W., Sijts, A.J., Kloetzel, P.M., and Dubiel, W. (2002). The RTP site shared by the HIV-1 Tat protein and the 11S regulator subunit alpha is crucial for their effects on proteasome function including antigen processing. *J Mol Biol* 323, 771-782.

Ishii, S., and Koziel, M.J. (2008). Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* 128, 133-147.

Jäkel, S., Kuckelkorn, U., Szalay, G., Plötz, M., Textoris-Taube, K., Opitz, E., Klingel, K., Stevanovic, S., Kandolf, R., Kotsch, K., *et al.* (2009). Differential interferon responses enhance viral epitope generation by myocardial immunoproteasomes in murine enterovirus myocarditis. *Am J Pathol* 175, 510-518.

Kamphausen, E., Kellert, C., Abbas, T., Akkad, N., Tenzer, S., Pawelec, G., Schild, H., van Endert, P., and Seliger, B. (2010). Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1273-1284.

Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G.E., Gonzalez, F., and Shastri, N. (2006). ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 25, 795-806.

Kawahara, M., York, I.A., Hearn, A., Farfan, D., and Rock, K.L. (2009). Analysis of the role of tripeptidyl peptidase II in MHC class I antigen presentation in vivo. *J Immunol* 183, 6069-6077.

Keller, M. (2009). Die Modulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems als Immunevasionsmechanismus des malignen Melanoms. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.

Khan, S., van den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, P.A., and Groettrup, M. (2001). Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol* 167, 6859-6868.

Kim, E., Kwak, H., and Ahn, K. (2009). Cytosolic aminopeptidases influence MHC class I-mediated antigen presentation in an allele-dependent manner. *J Immunol* 183, 7379-7387.

Kimura, Y., Gushima, T., Rawale, S., Kaumaya, P., and Walker, C.M. (2005). Escape mutations alter proteasome processing of major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 79, 4870-4876.

Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., and Goldberg, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274, 3363-3371.

Klare, N., Seeger, M., Janek, K., Jungblut, P.R., and Dahlmann, B. (2007). Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: "asymmetric" subunit composition, diversity and adaptation. *J Mol Biol* 373, 1-10.

Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-187.

Kloetzel, P.M. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 1695, 225-233.

Kopp, F., Dahlmann, B., and Kuehn, L. (2001). Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alpha/beta activator: ultrastructure and peptidase activities. *J Mol Biol* 313, 465-471.

Lee, L.N., Burke, S., Montoya, M., and Borrow, P. (2009). Multiple mechanisms contribute to impairment of type 1 interferon production during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *J Immunol* 182, 7178-7189.

Lelouard, H., Ferrand, V., Marguet, D., Bania, J., Camosseto, V., David, A., Gatti, E., and Pierre, P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J Cell Biol* 164, 667-675.

Lev, A., Princiotta, M.F., Zanker, D., Takeda, K., Gibbs, J.S., Kumagai, C., Waffarn, E., Dolan, B.P., Burgevin, A., Van Endert, P., *et al.*, (2010). Compartmentalized MHC class I antigen processing enhances immunosurveillance by circumventing the law of mass action. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 6964-6969.

Levy, F., Burri, L., Morel, S., Peitrequin, A.L., Levy, N., Bachi, A., Hellman, U., Van den Eynde, B.J., and Servis, C. (2002). The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol* 169, 4161-4171.

Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. (2005). Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol Rev* 207, 126-144.

Luckey, C.J., Marto, J.A., Partridge, M., Hall, E., White, F.M., Lippolis, J.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H. (2001). Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J Immunol* 167, 1212-1221.

Macpherson, E., Tomkinson, B., Balów, R.M., Hoglund, S., and Zetterqvist, O. (1987). Supramolecular structure of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes as studied by electron microscopy, and its correlation to enzyme activity. *Biochem J* 248, 259-263.

Milicic, A., Price, D.A., Zimbwa, P., Booth, B.L., Brown, H.L., Easterbrook, P.J., Olsen, K., Robinson, N., Gileadi, U., Sewell, A.K., *et al.* (2005). CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. *J Immunol* 175, 4618-4626.

Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.

Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M.A., Suzuki, E., Kalim, K.W., Lauer, C., Sylvain, C., Ring, E.R., Shields, J., Jiang, J., *et al.* (2009). A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 15, 781-787.

Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349-1353.

Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., and Monaco, J.J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J* 16, 5363-5375.

Nil, A., Firat, E., Sobek, V., Eichmann, K., Niedermann, G. (2004). Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur J Immunol* 34, 2681-2689.

Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanovic, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D.H., Huber, R., *et al.* (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12504-12509.

Nussbaum, A.K., Rodriguez-Carreno, M.P., Benning, N., Botten, J., and Whitton, J.L. (2005). Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *J Immunol* 175, 1153-1160.

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

Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., and Hämmerling, G.J. (1991). Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664.

Ossendorp, F., Eggers, M., Neisig, A., Ruppert, T., Groettrup, M., Sijts, A., Mengede, E., Kloetzel, P.M., Neefjes, J., Koszinowski, U., *et al.* (1996). A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity* 5, 115-124.

Parmentier, N., Stroobant, V., Colau, D., de Diesbach, P., Morel, S., Chapiro, J., van Endert, P., and Van den Eynde, B.J. (2010). Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nat Immunol* *11*, 449-454.

Preta, G., Marescotti, D., Fortini, C., Carcoforo, P., Castelli, C., Masucci, M., and Gavioli, R. (2008). Inhibition of serine-peptidase activity enhances the generation of a survivin-derived HLA-A2-presented CTL epitope in colon-carcinoma cells. *Scand J Immunol* *68*, 579-588.

Qian, S.B., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2005). Quantitating defective ribosome products. *Methods Mol Biol* *301*, 271-281.

Qian, S.B., Reits, E., Neefjes, J., Deslich, J.M., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2006). Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products. *J Immunol* *177*, 227-233.

Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., and Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* *18*, 97-108.

Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J.W., and Neefjes, J. (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* *20*, 495-506.

Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M., and Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* *404*, 774-778.

Remoli, A.L., Marsili, G., Perrotti, E., Gallerani, E., Ilari, R., Nappi, F., Cafaro, A., Ensoli, B., Gavioli, R., and Battistini, A. (2006). Intracellular HIV-1 Tat protein represses constitutive LMP2 transcription increasing proteasome activity by interfering with the binding of IRF-1 to STAT1. *Biochem J* *396*, 371-380.

Rock, K.L., Farfan-Arribas, D.J., and Shen, L. (2010). Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J Immunol* *184*, 9-15.

Rock, K.L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* *207*, 166-183.

Rock, K.L., York, I.A., Saric, T., and Goldberg, A.L. (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* *80*, 1-70.

Rockel, B., Peters, J., Kühlmorgen, B., Glaeser, R.M., and Baumeister, W. (2002). A giant protease with a twist: the TPP II complex from *Drosophila* studied by electron microscopy. *Embo J* *21*, 5979-5984.

Rockel, B., Peters, J., Müller, S.A., Seyit, G., Ringler, P., Hegerl, R., Glaeser, R.M., and Baumeister, W. (2005). Molecular architecture and assembly mechanism of *Drosophila* tripeptidyl peptidase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 10135-10140.

Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3, 1169-1176.

Saric, T., Graef, C.I., and Goldberg, A.L. (2004). Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem* 279, 46723-46732.

Saveanu, L., Carroll, O., Hassainya, Y., and van Endert, P. (2005a). Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol Rev* 207, 42-59.

Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., *et al.* (2005b). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* 6, 689-697.

Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S.R., *et al.* (2009). IRAP Identifies an Endosomal Compartment Required for MHC Class I Cross-Presentation. *Science* 325, 213-217.

Schatz, M.M., Peters, B., Akkad, N., Ullrich, N., Martinez, A.N., Carroll, O., Bulik, S., Rammensee, H.G., van Endert, P., Holzhütter, H.G., *et al.* (2008). Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands. *J Immunol* 180, 3210-3217.

Schmidt, N., Gonzalez, E., Visekruna, A., Köhl, A.A., Loddenkemper, C., Mollenkopf, H., Kaufmann, S.H., Steinhoff, U., and Joeris, T. (2010). Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut* 59, 896-906.

Schnurr, M., Orban, M., Robson, N.C., Shin, A., Braley, H., Airey, D., Cebon, J., Maraskovsky, E., and Endres, S. (2009). ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *J Immunol* 182, 1253-1259.

Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med* 50, 57-74.

Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R., and Dubiel, W. (1997). HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J Biol Chem* 272, 8145-8148.

Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schröter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., *et al.* (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142, 613-624.

Seifert, U., and Krüger, E. (2008). Remodelling of the ubiquitin-proteasome system in response to interferons. *Biochem Soc Trans* 36, 879-884.

Seifert, U., Liermann, H., Racanelli, V., Halenius, A., Wiese, M., Wedemeyer, H., Ruppert, T., Rispeter, K., Henklein, P., Sijts, A., *et al.* (2004). Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* *114*, 250-259.

Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., *et al.* (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* *4*, 375-379.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* *419*, 480-483.

Shin, E.C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C.M., Feinstone, S.M., Kloetzel, P.M., and Rehermann, B. (2006). Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* *116*, 3006-3014.

Shin, E.C., Seifert, U., Urban, S., Truong, K.T., Feinstone, S.M., Rice, C.M., Kloetzel, P.M., and Rehermann, B. (2007). Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver. *J Interferon Cytokine Res* *27*, 985-990.

Sijts, A., Sun, Y., Janek, K., Kral, S., Paschen, A., Schadendorf, D., and Kloetzel, P.M. (2002). The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol* *39*, 165-169.

Sijts, A., Zaiss, D., and Kloetzel, P.M. (2001). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in MHC class I antigen processing: implications for vaccine design. *Curr Mol Med* *1*, 665-676.

Sijts, A.J., Ruppert, T., Rehermann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P.M. (2000). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* *191*, 503-514.

Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schröter, C., Thompson, M.W., Hersh, L.B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Schild, H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* *1*, 413-418.

Strehl, B., Joeris, T., Rieger, M., Visekruna, A., Textoris-Taube, K., Kaufmann, S.H., Kloetzel, P.M., Kuckelkorn, U., and Steinhoff, U. (2006). Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* *177*, 6238-6244.

Strehl, B., Seifert, U., Krüger, E., Heink, S., Kuckelkorn, U., and Kloetzel, P.M. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* *207*, 19-30.

Sun, Y., Sijts, A.J., Song, M., Janek, K., Nussbaum, A.K., Kral, S., Schirle, M., Stevanovic, S., Paschen, A., Schild, H., *et al.* (2002). Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells. *Cancer Res* *62*, 2875-2882.

Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J.L., Manns, M.P., and Rehermann, B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6, 578-582.

Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., and Tanaka, K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275, 14336-14345.

Tanioka, T., Hattori, A., Masuda, S., Nomura, Y., Nakayama, H., Mizutani, S., and Tsujimoto, M. (2003). Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem* 278, 32275-32283.

Tenzer, S., Wee, E., Burgevin, A., Stewart-Jones, G., Friis, L., Lamberth, K., Chang, C.H., Harndahl, M., Weimershaus, M., Gerstoft, J., *et al.* (2009). Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol* 10, 636-646.

Textoris-Taube, K., Henklein, P., Pollmann, S., Bergann, T., Weisshoff, H., Seifert, U., Drung, I., Mügge, C., Sijts, A., Kloetzel, P.M., *et al.* (2007). The N-terminal flanking region of the TRP2360-368 melanoma antigen determines proteasome activator PA28 requirement for epitope liberation. *J Biol Chem* 282, 12749-12754.

Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T.P., Müller, J., *et al.* (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194, 1-12.

Tomkinson, B., and Lindas, A.C. (2005). Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1933-1937.

Tomkinson, B., Wernstedt, C., Hellman, U., and Zetterqvist, O. (1987). Active site of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes is of the subtilisin type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7508-7512.

Towne, C.F., York, I.A., Neijssen, J., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Neefjes, J.J., and Rock, K.L. (2005). Leucine aminopeptidase is not essential for trimming peptides in the cytosol or generating epitopes for MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 175, 6605-6614.

Towne, C.F., York, I.A., Neijssen, J., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Neefjes, J.J., and Rock, K.L. (2008). Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections. *J Immunol* 180, 1704-1712.

Towne, C.F., York, I.A., Watkin, L.B., Lazo, J.S., and Rock, K.L. (2007). Analysis of the role of bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses. *J Immunol* 178, 6923-6930.

Tsurumi, C., Firat, E., Gaedicke, S., Huai, J., Mandal, P.K., and Niedermann, G. (2009). Viability and DNA damage responses of TPPII-deficient Myc- and Ras-transformed fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 563-568.



- Tu, L., Moriya, C., Imai, T., Ishida, H., Tetsutani, K., Duan, X., Murata, S., Tanaka, K., Shimokawa, C., Hisaeda, H., *et al.* (2009). Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Immunol* *39*, 3385-3394.
- Van Deventer, S., and Neefjes, J. (2010). The Immunoproteasome Cleans up after Inflammation. *Cell* *142*, 517-518.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C., and Tonegawa, S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* *1*, 533-541.
- Villasevil, E.M., Guil, S., Lopez-Ferreras, L., Sanchez, C., Del Val, M., and Anton, L.C. (2010). Accumulation of polyubiquitylated proteins in response to Ala-Ala-Phe-chloromethylketone is independent of the inhibition of Tripeptidyl peptidase II. *Biochim Biophys Acta* *1803*, 1094-1105.
- Wang, E.W., Kessler, B.M., Borodovsky, A., Cravatt, B.F., Bogyo, M., Ploegh, H.L., and Glas, R. (2000). Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 9990-9995.
- Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C., and Hill, C.P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* *408*, 115-120.
- Yamano, T., Sugahara, H., Mizukami, S., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Yui, K., and Udono, H. (2008). Allele-selective effect of PA28 in MHC class I antigen processing. *J Immunol* *181*, 1655-1664.
- Yan, J., Parekh, V.V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagomez, D., Dragovic, S., Hill, T., Roopenian, D.C., Joyce, S., and Van Kaer, L. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J Exp Med* *203*, 647-659.
- Yewdell, J.W. (2005). Immunoproteasomes: regulating the regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 9089-9090.
- York, I.A., Brehm, M.A., Zendzian, S., Towne, C.F., and Rock, K.L. (2006). Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9202-9207.
- York, I.A., Chang, S.C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* *3*, 1177-1184.
- York, I.A., Mo, A.X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C.R., Saric, T., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* *18*, 429-440.

## 6. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel danke ich sehr für die Möglichkeit, mich als Medizinerin sowohl theoretisch als auch praktisch in die Biochemie einzuarbeiten. Das vertrauensvolle Überlassen eines sehr gut ausgestatteten Projektlabors teilweise mit Mitarbeitern war eine wesentliche Grundlage für die Durchführung der Projekte. Seine Diskussionsbereitschaft und sein gutes Augenmaß bzgl. der Durchführbarkeit haben sehr zum Gelingen der vielfältigen Projekte beigetragen.

Sehr herzlich danke ich meiner Doktormutter Frau PD Dr. Barbara Rehermann, die den Grundstein für mein wissenschaftliches Interesse gelegt hat und die mich bis heute im Rahmen von sehr interessanten Kooperationen zur Hepatitis-C-Virus-Infektion begleitet.

Meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer bin ich sehr dankbar für ihre ständige Bereitschaft und Unterstützung in allen Fragen zu Forschung und Wissenschaft.

Frau Christine Kurmeyer und Frau Dr. Nadine Westhoff danke ich für die Aufnahme in das Mentoring-Programm der Charité.

Sehr herzlich möchte ich meinen Kooperationspartnern danken: PD Dr. Annette Paschen, Prof. Dr. Dirk Schadendorf, Dr. Jan Kessler, Dr. Anne Hosmalin, Dr. Eui-Cheol Shin, Dr. Anne Halenius, Prof. Dr. Hartmut Hengel, Dr. Xiaohua Huang, Prof. Dr. Wolfgang Dubiel, Dr. Britta Strehl, Dr. Christina Montag, Prof. Dr. Christian Hagemeyer, PD Dr. Hortense Slevogt und Dr. Antje Voigt. Diese Kooperationen haben mir große Freude gemacht und haben die Arbeit noch viel interessanter gestaltet.

Ohne die große Unterstützung meiner technischen Assistentin Elke Bürger, die durch ihre Begeisterung, ihren Fleiß und ihre Einsatzkraft die Projekte bis zum jetzigen Stand gebracht hat, wäre deren Bearbeitung nicht möglich gewesen. Ebenfalls danke ich Ingrid Krenz für ihre hervorragende Arbeit, die vor allem in der Anfangsphase der Gruppe wichtig war. Frau Dr. Reimann danke ich für ihre Mitarbeit und Hilfe bei mehreren Projekten. Dr. Alice Sijts danke ich dafür, dass sie mich in das Thema „Antigen-Prozessierung“ eingeführt hat.

Meinen Doktoranden Dr. Sabrina Urban, Dr. Martin Keller und Julia Paschke bin ich sehr dankbar für ihr Engagement, das wesentlich zum Erfolg der Projekte beigetragen hat.

Kathrin Textoris-Taube (Massenspektrometrie) und Dr. Frédéric Ebstein danke ich sehr herzlich für ihre ständige Bereitschaft, mich in fachlichen Fragen und darüber hinaus zu unterstützen. Kathrin und Antje bin ich darüber hinaus sehr dankbar, dass sie meine Arbeit gelesen und korrigiert haben.

Den Gruppenleitern Prof. Dr. Elke Krüger, Dr. Ulrike Kuckelkorn, Prof. Dr. Burkhardt Dahlmann, Dr. Michael Seeger, PD Dr. Cordula Enenkel, Dr. Katharina Janek und Dr. Petra Henklein gilt mein herzlicher Dank für ihre Unterstützung in Forschung und Lehre.

Allen Mitarbeitern der AG Kloetzel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Anregungen in Belangen rund um die wissenschaftliche Arbeit.

Christoph danke ich für seine große Unterstützung während der letzten Jahre. Meinen Eltern danke ich für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, meinen Sohn Philipp zu betreuen und mir auch in allen anderen Belangen den Rücken freizuhalten. Christine danke ich sehr für ihre Unterstützung bei der Betreuung von Philipp. Und schließlich gilt mein ausgesprochenes Dankeschön an Philipp, der immer Verständnis für meine Arbeit hatte.

## 7. Eidstattliche Versicherung

### ERKLÄRUNG

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

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift