

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**

Analyse der Wirkung von Proteasominhibitoren  
auf HCMV-infizierte Colonkarzinom-Zellen

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

**Laura-Marie Uta Schröder**  
**2023889**

Hamburg

am 3. September 2014

- |                                |                     |                  |
|--------------------------------|---------------------|------------------|
| <b>1. Gutachter:</b> Prof. Dr. | Claus-Dieter Wacker | (HAW Hamburg)    |
| <b>2. Gutachter:</b> Prof. Dr. | Elke Bogner         | (Charité Berlin) |

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Institutes für Medizinische Virologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

## Danksagung

Hiermit danke ich zunächst meiner Betreuerin und AG-Leiterin Prof. Dr. Elke Bogner für die Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit in Ihrer Forschungsgruppe mitzuwirken.

Ich bedanke mich außerdem für die kompetente Betreuung und wertvollen Hinweise zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. Gabriele Pecher danke ich für die Vermittlung des Praktikums und der Abschlussarbeit.

Besonderen Dank gilt ebenso Rebekka Paeschke für die Unterstützung beim Einstieg in die Thematik, Christina Priemer für ihre tatkräftige Unterstützung in der täglichen Laborarbeit, sowie Ira Napierkowski für Ihre fachliche Hilfe und für ihre treue Begleitung beim Mittagessen.

Herrn Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Virologie der Charité meine Bachelorarbeit zu schreiben und den regelmäßigen Forschergruppentreffs beizuwohnen.

Ich bedanke mich bei der HAW Hamburg, insbesondere Prof. Dr. Claus Dieter Wacker für die freundliche Betreuung dieser Arbeit und die stetige Hilfe bei allen Anliegen.

Mein persönlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Tobi für ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	4
1 Einleitung .....	6
1.1 Das Humane Cytomegalievirus (HCMV) .....	6
1.1.1 Taxonomie und Epidemiologie .....	6
1.1.2 Morphologie .....	7
1.1.3 Virale Genexpression im lytischen Infektionszyklus .....	9
1.1.4 Morphogenese .....	10
1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) .....	12
1.2.1 Aufbau des 26S-Proteasoms .....	13
1.2.2 Klassifikation und Wirkungsweise von Proteasominhibitoren (PI) .....	14
1.2.3 Wechselwirkung zwischen HCMV und dem UPS .....	16
2 Problemstellung .....	17
3 Material und Methoden .....	18
3.1 Materialien .....	18
3.1.1 Zellen .....	18
3.1.2 Virusstamm .....	18
3.1.3 Geräte .....	18
3.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	19
3.1.5 Chemikalien .....	19
3.1.6 Kommerzielle Kits .....	20
3.1.7 Antikörper .....	21
3.1.8 Proteasominhibitoren .....	21
3.1.9 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien .....	22
3.2 Methoden .....	23
3.2.1 Zellbiologische Methoden .....	23
3.2.1.1 Kultivierung von Caco-2- und HELF Fi301-Zellen .....	23
3.2.1.2 Anzucht von HCMV .....	24
3.2.1.3 Experimentelle HCMV-Infektion .....	24
3.2.1.4 Plaquereduktionsassay .....	25
3.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	28
3.2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz .....	28
3.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	29
3.2.2.3 Immunoblot .....	30

4	Ergebnisse.....	32
4.1	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die HCMV-Replikation.....</i>	32
4.2	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Virionenfreisetzung .....</i>	34
4.3	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Verbreitung von HCMV über Zell-Zell Kontakte .....</i>	35
4.4	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die virale Proteinexpression .....</i>	37
4.4.1	Analyse der Proteinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	37
4.4.2	Analyse der Proteinexpression mittels Immunoblot .....	40
5	Diskussion .....	42
5.1	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die HCMV-Replikation.....</i>	42
5.2	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Virionenfreisetzung .....</i>	43
5.3	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Verbreitung von HCMV über Zell-Zell Kontakte .....</i>	44
5.4	<i>Einfluss der Proteasominhibitoren auf die virale Proteinexpression .....</i>	45
6	Zusammenfassung .....	48
7	Abbildungsverzeichnis .....	50
8	Tabellenverzeichnis .....	52
9	Literaturverzeichnis .....	54
10	Anhang.....	61
10.1	<i>Bestimmung der EC<sub>50</sub> (Abschnitt 4.1).....</i>	61
10.1.1	EC <sub>50</sub> von Bortezomib in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen (MOI=10).....	61
10.1.2	EC <sub>50</sub> von MG132 in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen (MOI=10).....	62
10.2	<i>Yieldreduktionsassay.....</i>	64
10.2.1	Yieldreduktionsassay mit Überstand (Abschnitt 4.2).....	64
10.2.2	Yieldreduktionsassay mit zellassoziertem Virus (Abschnitt 4.3) .....	65
10.3	<i>Fotos der Immunfluoreszenz (Vergrößerung: 40x).....</i>	66
10.4	<i>Membranen des Immunoblots .....</i>	68

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
Abb.	Abbildung
AD169	Laborstamm HCMV
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
BZ	Bortezomib
Caco-2	Carcinoma Colon
CC <sub>50</sub>	<i>cytotoxic concentration 50 %</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DG	Deckgläschen
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	<i>early</i>
EC <sub>50</sub>	<i>effective concentration 50 %</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FKS	Fötale Kälberserum
gB	Glykoprotein B
HCl	Salzsäure
HCMV	<i>Human Cytomegalovirus</i> (Humanes Cytomegalievirus)
hDaxx	<i>human Death-associated protein 6</i>
HELF	Humane embryonale Lungenfibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Humane Fibroblasten
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HHV 5	Humanes Herpesvirus 5
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IB	Immunoblot
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration 50 %</i>
IE	<i>immediate early</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IkBa	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha – Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB
IR	<i>internal repeat</i>
kbp	Kilo-Basenpaare (= 1000 Basenpaare)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L	<i>late</i>
mAb	monoklonaler Antikörper

MCP	<i>major capsid protein</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
Methocel	Methylzellulose-Kulturmedium
MG132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIEP	<i>Major Immediate Early Promotor</i>
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MW	Mittelwert
NaB	Natriumbutyrat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acid</i> - nicht essentielle Aminosäuren
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> – Transkriptionsfaktor
NIEPs	<i>non-infectious enveloped particles</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PA	Plaquereduktionsassay
PAA	Polyacrylamid
pAb	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFU	<i>Plaque Forming Units</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PI	Proteasominhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis</i>
SI	<i>selectivity index</i>
STABW	Standardabweichung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans-Golgi Network</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TR	<i>terminal repeat</i>
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
Triton X-100	Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
Tween20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
u.a.	und andere
UL	<i>unique long</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
US	<i>unique short</i>
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Humane Cytomegalievirus (HCMV)

### 1.1.1 Taxonomie und Epidemiologie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV), das humane Herpesvirus 5 (HHV 5), ist eines der acht bekannten humanen Herpesviren und gehört zur Familie der *Herpesviridae* [1]. Eine charakteristische Eigenschaft von humanen Herpesviren ist, dass sie nach einer Erstinfektion lebenslang im Körper persistieren [2]. Durch Einwirkung bestimmter Faktoren, wie z.B. Infektionen, Inflammationen, Immunsuppressionen oder Stress [3, 4, 5], kommt es zur Reaktivierung des Virus und damit zur Virussynthese [2].

Gemäß der Virusklassifikation gehört das HCMV zur Unterfamilie der *β-Herpesvirinae*. Kennzeichnend für die *β-Herpesvirinae* sind u.a. das *in vivo* enge Wirtsspektrum, der *in vitro* lange Replikationszyklus (72 h) und der zytopathische Effekt der Virusinfektion [6, 7]. Der zytopathische Effekt beruht auf einer Vergrößerung infizierter Zellen (Zytomegalie), die auf die Bildung von intranukleären und cytoplasmatischen Einschlusskörperchen zurückzuführen ist [2, 8].

Die Übertragung des HCMV erfolgt sowohl horizontal als auch vertikal. Horizontal kann HCMV durch Tröpfcheninfektion, Geschlechtsverkehr, Bluttransfusionen oder Organtransplantationen übertragen werden [9]. Die vertikale Übertragung kann während oder nach einer Schwangerschaft auf den Säugling durch die Muttermilch erfolgen. Die Inkubationszeit bei einer Primärinfektion dauert 4 bis 12 Wochen [9, 10].

Nach einer Infektion vermehrt sich das Virus in Monozyten, Epithel- und Endothelzellen, in welchen es cytomegale Veränderungen – auch als Eulenaugen bezeichnet – hervorruft. Im latenten Zyklus verbleiben die Viren hauptsächlich in der Speicheldrüse, den Granulozyten und Lymphozyten [1]. Man findet das Virus daher in nahezu allen Körperflüssigkeiten wie etwa im Urin, Speichel, Sperma, in den Zervixsekreten und in der Muttermilch, wo es in unterschiedlichen Mengen ausgeschieden wird [2, 10]. Primärinfektionen und durch exogene oder endogene Stressoren hervorgerufene Reaktivierungen verlaufen bei Erwachsenen meist asymptomatisch [1]. Bei einem symptomatischen Verlauf kommt es zu mononukleose-ähnlichen Krankheitssymptomen mit Lymphknotenschwellungen, Muskelschmerzen und einer erhöhten Lymphozytenzahl [1]. Besonders schwerwiegend verlaufen HCMV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten (AIDS-Patienten oder Organtransplantat-

empfänger). Typische Krankheitsbilder sind Enteritis, Hepatitis, Meningitis, Pneumonie und Retinitis [11].

HCMV ist ein ubiquitäres Pathogen. Die Durchseuchungsrate weltweit ist jedoch unterschiedlich. Einen wesentlichen Einfluss haben hier die geographische Lage, das Alter und sozioökonomische Faktoren. In Industrieländern sind etwa 50 % und in den Entwicklungsländern ca. 90 % der Erwachsenen mit dem HCMV infiziert [6, 12].

Während der Schwangerschaft beträgt die Wahrscheinlichkeit das Ungeborene bei einer Erstinfektion oder Reaktivierung zu infizieren 40 %. Weltweit sind ca. 0,3 bis 2,5 % aller Neugeborenen mit HCMV infiziert. Eine HCMV-Infektion zählt damit zur häufigsten kongenitalen Virusinfektion [13, 14]. 10 % der infizierten Neugeborenen erleiden Spätschäden wie Organschäden, Wachstumsretardierungen, Schwerhörigkeit oder andere zentralnervöse Schädigungen. Auch können Symptome wie Gelbsucht oder Mikrozephalie auftreten [14].

Bei schwer verlaufenden HCMV-Infektionen kommen Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir intravenös und Valganciclovir oral als Therapie zum Einsatz, die jedoch toxische Nebeneffekte besitzen [6, 15]. Der allgemeine Wirkmechanismus der genannten Virostatika ist die Inhibition der Replikation viraler DNA [16]. Die latente Infektion bleibt dabei unbeeinflusst [17].

Impfstoffe gegen HCMV sind derzeit noch in der Entwicklung. Es gibt allerdings schon die Möglichkeit einer passiven Immunisierung mit HCMV-Hyperimmunglobulin, das eine Immunglobulinpräparation mit hochtitrigen HCMV-spezifischen IgG-Antikörpern darstellt.

Die passive Immunisierung mit HCMV-Hyperimmunglobulin wird bei Organtransplantatempfängern eingesetzt und bildet seit kurzem sogar eine erfolgreiche Strategie zur Prävention kongenitaler HCMV-Infektionen [11, 14].

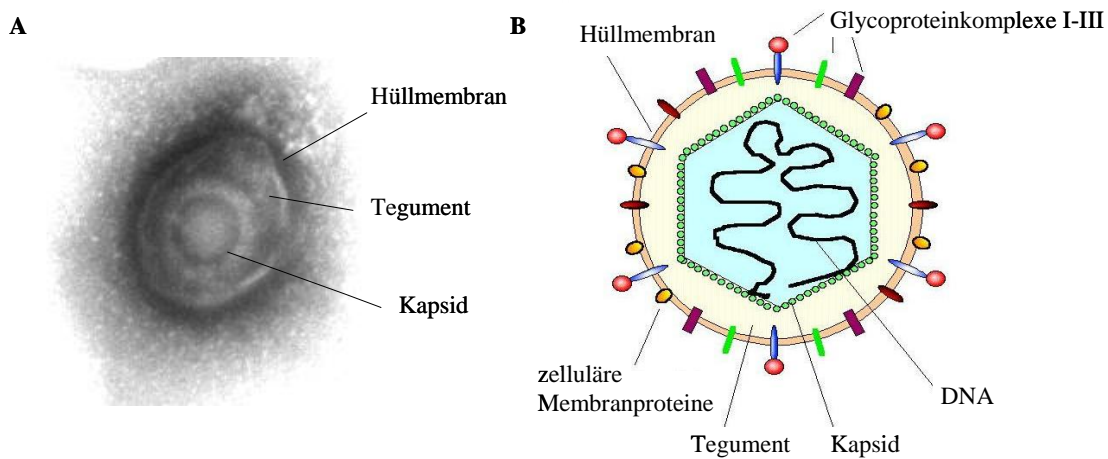
### **1.1.2 Morphologie**

Herpesviren bestehen aus einem Kapsid, dem Tegument und der äußeren Membranhülle (siehe Abb. 1). Auch die 150-200 nm großen Virionen des humanen Cytomegalievirus weisen diese Struktur auf [18]. Das virale DNA-Genom mit einer Größe von 235 kbp wird von dem aus 162 Kapsomeren bestehenden ikosaedrischen Kapsid umschlossen, das weiterhin von einer äußeren Lipidmembran umgeben ist [6, 19]. Der Bereich zwischen Kapsid und äußerer Membranhülle wird als Tegument bezeichnet, welches eine amorph erscheinende, proteinöse Matrix darstellt. Über die Hälfte der 71 bekannten viralen Strukturproteine in einem



infektiösen HCMV-Virion sind Bestandteil des Teguments. Die Funktionen der Tegumentproteine liegen zum einen im Abbau der Partikel während des Viruseintritts in die Zelle, in der Anregung der viralen Genexpression und zum anderen im Zusammenbau der Virionen sowie in der Immunevasion in der Zelle [19, 20, 21].

In die Membranhülle der Virionen sind eine Vielzahl von komplexartig organisierten viralen Glykoproteinen integriert, die für die Adsorption der Virionen und deren Eindringen durch Fusion der Virushülle mit der Wirtszelle verantwortlich sind [6]. Der Glykoproteinkomplex I stellt ein Homodimer des Glykoproteins gB dar [22]. Der Glykoproteinkomplex II wird aus den Glykoproteinen gM und gN [23] und der Glykoproteinkomplex III aus gH, gL und gO gebildet [24, 25].



**Abb. 1: (A) Elektronenmikroskopische [26] und (B) schematische Darstellung des humanpathogenen Cytomegalievirus.**

Das virale DNA-Genom innerhalb des Kapsids ist ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül mit einem Molekulargewicht von  $1,5 \times 10^8$  Da [27], welches ca. 150 ORFs beinhaltet, von denen ca. 40 für die HCMV-Replikation essentiell sind [28]. Es besteht aus zwei unterschiedlich langen, nicht-repetitiven Sequenzen – *unique long* ( $U_L$ ) und *unique short* ( $U_S$ ), die durch repetitive Bereiche - den *internal repeats* ( $IR_L$ ,  $IR_S$ ) - miteinander verbunden werden. Dabei flankieren die *terminal repeats* ( $TR_L$ ,  $TR_S$ ) jeweils  $U_L$  und  $U_S$  (siehe Abb. 2) [12, 29]. Virale Gene werden mithilfe der Präfixe TRS, TRL, IRS, IRL, UL oder US benannt, die den Genomabschnitt kennzeichnen, an dem sie lokalisiert und fortlaufend nummeriert sind [21, 30].

Die *a*-Sequenz, die für die Replikation der viralen DNA verantwortlich ist, existiert in der langen Region ein Mal, in der kurzen kommt sie jedoch mehrmals vor. B und b' bzw. c und c' beschreiben zwei identische, zueinander invertierte Sequenzen. Durch unterschiedliche

Anordnung von b, b', c und c' ergeben sich vier Isoformen des Genoms, die äquimolar auftreten [30].

Für die Replikation *in vitro* wird ein Großteil der Gene nicht benötigt [6]. Jedoch kommt ihnen bei den Virusreproduktionen *in vivo* eine maßgebliche Bedeutung zu. Einigen Laborstämmen, wie z.B. AD169, fehlen gegenüber Patientenisolaten bestimmte ORFs, die durch Anpassung an die Zellkultur deletiert wurden [6, 18].



**Abb. 2: Schematische Darstellung des DNA-Genoms des humanen Cytomegalievirus (HCMV).** Das Genom des HCMV setzt sich aus zwei unterschiedlich langen, nicht-repetitiven Sequenzen – *unique long* ( $U_L$ ) und *unique short* ( $U_S$ ) zusammen, die durch repetitive Bereiche - den *internal repeats* ( $IR_L$ ,  $IR_S$ ) miteinander verbunden werden. *Terminal repeats* ( $TR_L$ ,  $TR_S$ ) flankieren jeweils  $U_L$  und  $U_S$ .  $A_n$ ,  $a'_m$  und  $a$ ,  $b$  und  $b'$  bzw.  $c$  und  $c'$  beschreiben zwei identische, zueinander invertierte Sequenzen. Durch unterschiedliche Anordnung dieser zueinander invertierten Sequenzen können vier Isoformen des Genoms gebildet werden, die in gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten [31].

### 1.1.3 Virale Genexpression im lytischen Infektionszyklus

HCMV ist in der Lage eine große Zahl unterschiedlicher Zellarten zu infizieren. Dazu gehören Epithel-, Endothel- oder Muskelzellen, Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen [6]. Nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle gelangen Kapsid und Tegument über das Cytoplasma zu den Poren des Zellkerns, wo das virale Genom in das Nukleoplasma entlassen wird [21, 32]. Die Genexpression des humanen Cytomegalievirus ist wie bei allen Herpesviren zeitlich reguliert und findet kaskadenartig im Zellkern statt [21]. Sie wird durch verschiedene Mechanismen aktiviert, u.a. durch den Transaktivator pp71 (UL82) – ein Tegumentprotein des HCMV [19, 20, 21]. Ein Replikationszyklus umfasst ca. drei Tage und gliedert sich in drei unterschiedliche Phasen, in denen Gene exprimiert werden: die sehr frühe (*immediate early*, *IE*), die frühe (*early*, *E*) und die späte (*late*, *L*) Phase [6]. Dabei wirken die Genprodukte der davor liegenden Expressionsphase regulierend auf die Genexpression der darauf folgenden Phase [33].

Die *immediate early* Phase beginnt unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle und ist mit der Transkription der sehr frühen (*immediate early*, *IE*) Gene durch die RNA-Polymerase II verbunden. Die Mehrheit der IE-Gene werden in der sogenannten *major immediate early* (MIE)-Genregion exprimiert, zu der UL123 (IE1) und UL122 (IE2) gehören.

Diese werden von einem MIE-Promotor und dessen Enhancers kontrolliert [34]. Durch Transkription des UL123 entsteht ein Protein (IE72) mit der Größe von 72 kDa. Durch alternatives Spleißen der IE2-Transkripte werden 55 kDa Proteine (IE55) und 86 kDa Proteine (IE86) gebildet [35, 36].

IE1- und IE2-Proteine spielen eine bedeutende Rolle in der Genexpression der nachfolgenden viralen (*early*, *late*) sowie einigen zellulären Proteinen [37, 38].

Nach ca. 3 h *post infectionem* (p.i.) beginnt die *early* Phase der viralen Genexpression, in der die Mehrheit der viralen aber vor allem Nichtstrukturproteine exprimiert wird. Dazu zählen Proteine, die für die virale DNA-Replikation oder Immunevasion benötigt werden, wie z.B. die virale DNA-Polymerase pUL54, deren Prozessivitätsfaktor pUL44 und das DNA-Einzelstrang-bindende Protein pUL57 [39, 40]. Die DNA-Replikation erfolgt nach dem *rolling circle*-Prinzip 14-16 h p.i. [41, 42]. Das Ergebnis ist ein linearer DNA-Strang aus Konkatemeren, die vielfach aneinandergereihte Kopien des viralen Genoms darstellen [39].

Nach der Replikation viraler DNA beginnt die *late* Phase, in der im Wesentlichen Strukturproteine des HCMV-Virions hergestellt werden [21]. Zu den gebildeten Strukturproteinen gehören Kapsid-, Tegument- und Membranproteine [39]. Hauptbestandteil der viralen Kapside stellt das *major capsid protein* (MCP) dar. Bei den Tegumentproteinen ist pp65 (UL83) am häufigsten. Dessen Nachweis wird anhand eines pp65-Antigentests zur Diagnose für eine HCMV-Infektion genutzt [12]. Das immunogene Phosphoprotein pp28 ist ebenfalls ein Tegumentprotein, das von UL99 kodiert wird und für die finale Membranhüllung der HCMV-Partikel im Cytoplasma verantwortlich ist [21, 43].

### 1.1.4 Morphogenese

Die Morphogenese findet in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle statt und beinhaltet Aktivitäten sowohl viraler als auch zellulärer Proteine.

Die Reifung von HCMV-Virionen beginnt im Zellkern mit der Assemblierung von Kapsidproteinen zu Prokapsiden, in die anschließend die replizierte virale DNA verpackt wird (siehe Abb. 3) [21, 44, 45].

Die bei der Replikation gebildete konkatemere DNA wird durch die kleine Untereinheit pUL89 der viralen Terminase in einzelne Genomeinheiten gespalten [46, 47]. Danach katalysiert die große Untereinheit der Terminase pUL56 die ATP abhängige Verpackung der viralen DNA in die Prokapside [48, 49].

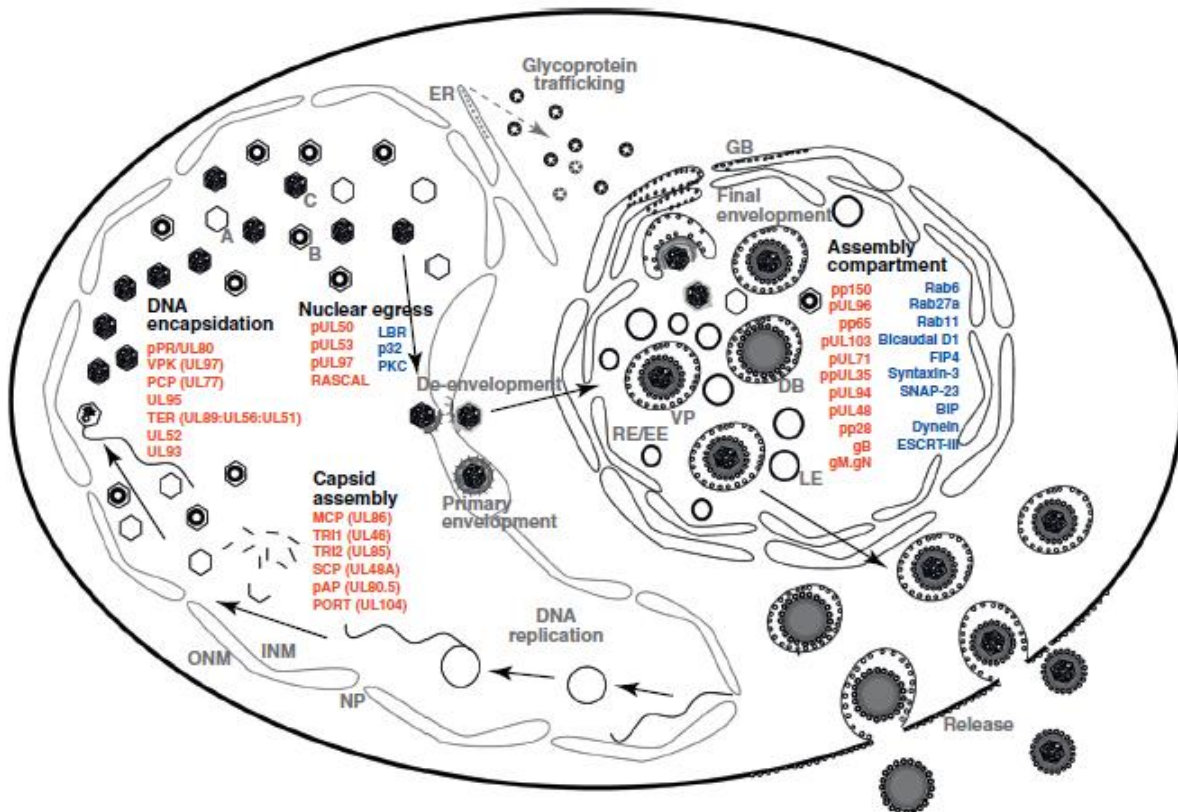
Bei der DNA-Verpackung in die viralen Kapside können drei verschiedenen zusammengesetzte Kapside unterschieden werden: A-, B- und C-Kapside [31, 50]. A-Kapside entstehen durch abortive DNA-Verpackung. Sie enthalten keine virale DNA [31, 51]. Die B-Kapside, die eigentlichen Prokapside, enthalten das Gerüstprotein (*scaffolding protein*) [52, 53], das während der Reifung zu den C-Kapsid entfernt wird [50]. Dieses Gerüstprotein ist für die Anordnung der Strukturkomponenten *major capsid protein* (MCP), *minor capsid protein* (mCP) und *smallest capsid protein* (SCP) im Kapsid verantwortlich [54]. C-Kapside werden durch Insertion viraler DNA in die B-Kapside gebildet [31, 51].

Reife A- sowie C-Kapside verlassen durch einen mehrstufigen Knospungsprozess den Nukleus. In einem ersten Schritt gelangen die Kapside durch die innere Kernmembran in den perinukleären Spalt. Dort erhalten sie eine transiente Membranhülle, die durch Fusion mit der äußeren Kernmembran wieder verloren geht. Der letzte Schritt bewirkt die Translokation der Kapside in das Cytoplasma [55].

Im Cytoplasma werden die Kapside mit Tegumentproteinen assoziiert. Die endgültige Hülle erhalten die vom Tegument umgebenen Kapside, wenn sie in die Vesikel des trans-Golgi-Netzwerks (TGN) bzw. der tubulären Endosomen knospen [56].

In deren Membranen wurden bereits virale Glykoproteine integriert [45, 55]. Die Freisetzung der gebildeten Virionen in den extrazellulären Raum erfolgt mittels Exozytose [43, 57].

Bei der Morphogenese werden zusätzlich zu den infektiösen HCMV-Virionen auch nicht-infektiöse Partikel wie *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) oder *dense bodies* gebildet [21, 58]. Der Aufbau von NIEPs entspricht dem von infektiösen Virionen: Virushülle, Tegument und Kapsid. Im Unterschied zu den infektiösen Partikeln stellt das Kapsid der NIEPs ein A-Kapsid dar. *Dense bodies* sind mit einer Virusmembran umhüllte Tegumentproteine, bei denen Kapsid und dementsprechend auch das DNA-Genom abwesend sind. Sie bestehen vorwiegend aus dem viralen Protein pp65. Die genaue Bedeutung dieser beiden nicht-infektiösen Partikel ist noch unklar [21, 58].



**Abb. 3: Reifung der Virionen des humanen Cytomegalievirus (HCMV).** Die Morphogenese von HCMV beginnt im Zellkern mit der Assemblierung von Kapsidproteinen zu Prokapsiden. Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Kapsiden: A-, B- und C-Kapsid. Durch Insertion viraler DNA in die Prokapside entstehen C-Kapside, die den Zellkern durch Transportknospung an der zellulären Membran verlassen. Im Cytoplasma erfolgt die Anlagerung von Tegumentproteinen an die C-Kapside, die ihre finale Hülle durch Knospung in die Vesikel des TGN bzw. tubulären Endosoms erhalten. Dadurch erhalten sie ihre finale Hülle, in die bereits die viralen Glykoproteine integriert sind. Durch Exozytose werden die ausgereiften HCMV-Virionen in den extrazellulären Raum freigesetzt. Die an der Morphogenese beteiligten viralen Proteine bzw. die aus der Wirtszelle stammenden Proteine werden in der Abbildung rot bzw. blau dargestellt. Abkürzungen: A, B, C – verschiedene Arten des Kapsids; DB – dense body; EE/RE – frühes Endosom/recycling Endosom; ER – endoplasmatisches Reticulum; GB – Golgi body; INM – innere Kernmembran; LE – spätes Endosom; NP – Kernpore; ONM – äußere Kernmembran; VP – Viruspartikel [45].

## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

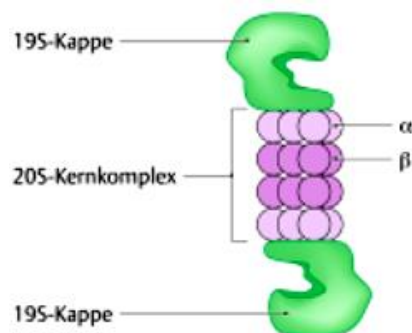
Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein eukaryotisches Proteinqualitätskontrollsystem, dessen Funktion darin besteht, den Abbau regulatorischer, viraler oder falsch gefalteter Proteine zu regulieren. Das UPS spielt durch den Abbau von regulatorischen Proteinen eine wichtige Rolle in deren Stoffwechselregulierung und damit in der Regulierung des Zellzyklus sowie des Zellwachstums und der Apoptose [59, 60]. Störungen des UPS spielen eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten wie Krebs, Inflammationen oder neurodegenerativer Erkrankungen [61].

Bevor die Degradation erfolgt, werden die abzubauenen Proteine durch einen mehrstufigen enzymatischen Prozesses mit einer Polyubiquitin-Kette markiert. Dies wird durch die drei Enzymklassen (Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), Ubiquitin-ligierendes Enzym (E3)) realisiert [62]. Durch Bindung an E1 wird das aus 76 Aminosäuren aufgebaute Ubiquitin aktiviert und auf E2 übertragen. Durch verschiedene E3 Ubiquitin-Ligasen wird die letztendliche spezifische Markierung mit Polyubiquitin-Ketten des Zielproteins gewährleistet. Erst dadurch sind die Substrate für die regulatorischen Untereinheiten des 26S-Proteasoms erkennbar [63].

Allerdings können einige Proteine auch Ubiquitin-unabhängig durch das 26S-Proteasom abgebaut werden [64].

### 1.2.1 Aufbau des 26S-Proteasoms

Das 26S-Proteasom ist ein multimerer Proteinkomplex mit einer Molekülmasse von ungefähr 2.000 kDa [65], das sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern eukaryotischer Zellen vorkommt.

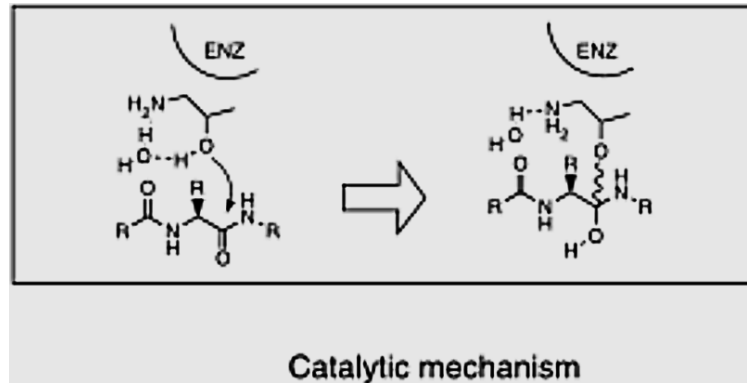


**Abb. 4: Aufbau des 26S-Proteasoms.** Das 26S-Proteasom besteht aus einer hohlzylinderförmigen, katalytischen 20S-Untereinheit, die zu beiden Enden durch jeweils eine kappenförmige, regulatorische 19S-Untereinheit abgegrenzt wird. Die äußeren Ringe der 20S-Untereinheit setzen sich aus  $\alpha$ - und die inneren Ringe aus  $\beta$ -Strukturen zusammen [66].

Das 26S-Proteasom ist aus einer hohlzylinderförmigen, katalytischen 20S-Untereinheit, die zu beiden Enden durch jeweils eine kappenförmige, regulatorische 19S-Untereinheit abgegrenzt wird, aufgebaut (siehe Abb. 4) [67].

Der 20S-Komplex besteht aus 4 Ringen à 7 Untereinheiten. Dabei setzen sich die äußeren Ringe aus  $\alpha$ - und die inneren Ringe aus  $\beta$ -Strukturen zusammen. Im Zentrum des Hohlzylinders befinden sich die proteolytisch aktiven Zentren [68].

Im katalytischen Zentrum des 26S-Proteasoms befindet sich am N-Terminus ein Threoninrest, der als Nucleophil fungiert und für die Spaltung der Peptidbindung verantwortlich ist (siehe Abb. 5), sodass dieser Proteinkomplex auch als Threonin-Protease bezeichnet wird [69].



**Abb. 5: 26S-Proteasom als Threonin-Protease.** Der Threoninrest am N-Terminus im katalytischen Zentrum des 26S-Proteasoms fungiert als Nucleophil und ist somit für die Spaltung der Peptidbindungen bei Proteinen verantwortlich [70].

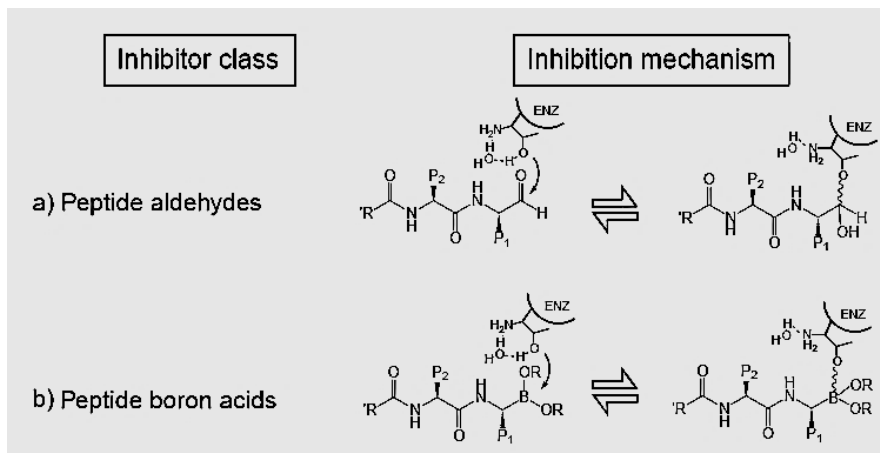
Bei der Degradation der mit Polyubiquitin-Ketten markierten Substrate erkennt die 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms diese spezifisch und bindet sie. Das Substrat wird entfaltet, zu den aktiven Zentren der 20S-Untereinheit transportiert und dort abgebaut [66].

### 1.2.2 Klassifikation und Wirkungsweise von Proteasominhibitoren (PI)

Die Funktion von Proteasominhibitoren besteht darin, das 26S-Proteasom in seiner proteolytischen Funktionsweise zu hemmen, sodass eine Blockade der Stoffwechselwege entarteter Zellen induziert wird. Aufgrund seiner einzigartigen Wirkungsweise ist eine spezifische Hemmung des 26S-Proteasoms möglich. Dadurch eröffnen sich neue Behandlungsmöglichkeiten beispielsweise für Krebs, Entzündungskrankheiten oder Erkrankungen des Immunsystems [71].

Bei den PI unterscheidet man zunächst zwischen den natürlich vorkommenden Proteasominhibitoren - wie Lactacystin (aus *Streptomyces lactacystinaeus*) [72] und Epoxomizin [73] (aus *Actinomycetes*) - und den synthetisch hergestellten PI. Zwei wichtige Gruppen der synthetisch hergestellten PI sind die Peptidaldehyde, zu denen auch MG132 gehört, und deren effizienter wirksamerer Abkömmlinge - die Peptidboronate, deren wichtigster Vertreter Bortezomib ist [74]. Ferner gehören Bortezomib sowie MG132 zu den reversiblen PI [70, 75, 76].

Das Grundgerüst der Peptidaldehyde sowie Peptidboronate sind Peptidbindungen, die eine Imitation eines Proteinsubstrates darstellen. Die Aldehydelektrophile der Peptidaldehyde sowie die Elektrophilen der Peptidboronate (Boratom) reagieren mit dem nucleophilen Threoninrest des katalytischen Zentrums des 26S-Proteasoms, was zur Bildung eines Hemiacetals führt (siehe Abb. 6). Dadurch wird die Substrattasche des 26S-Proteasoms blockiert, sodass dessen Funktionsfähigkeit nicht mehr vorhanden ist [70].



**Abb. 6: Generelle Struktur und Wirkungsweise verschiedener synthetischer reversibler PI.** Gezeigt werden Peptidaldehyde und deren Abkömmling – die Peptidboronate. Als Grundstruktur erweist sich eine Aneinanderreihung von Peptidbindungen, die ein Proteinsubstrat imitieren. Die Elektrophilen der Aldehyde sowie das elektrophile Boratom der Boronate bilden hochaffine Reaktionspunkte für den N-terminal gelegenen nucleophilen Threoninrest des 26S-Proteasoms. Es kommt zur Bildung eines Hemiacetals, zur Blockierung der Substratbindungstasche des 26S-Proteasoms und damit zur dessen Inaktivierung [70].

Durch die Hemmung des 26S-Proteasoms ist die Konzentration regulatorischer Proteine im Cytoplasma zu den jeweiligen Zellzyklen verändert. Zykline, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus besitzen [77], werden z.B. nicht mehr abgebaut. Ein Fortlaufen des Zellzyklus und damit der mitotischen Zellproliferation werden unterbrochen, da es zu einem „Informationschaos“ kommt. Außerdem werden in der Zelle noch viele weitere Signalkaskaden unterbrochen, was zur Apoptose der Zelle führt [78, 79].

Eine wichtige Signalkaskade, die durch Bortezomib blockiert wird, ist die durch TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung. NF- $\kappa$ B spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen und immunologischen Zellvorgängen. Dessen Aktivierung hat einen antiapoptotischen und wachstumsstimulierenden Effekt [80, 81]. Durch die Inhibition des 26S-Proteasoms kann der Inhibitor von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) nicht mehr degradiert werden, sodass NF- $\kappa$ B an seiner Funktion als Transkriptionsfaktor und folglich die Tumorzelle in ihrem Wachstum gehindert wird [74].



Mehrere Autoren konnten experimentell darlegen, dass Tumorzellen, die besonders von der Funktion des 26S-Proteasoms abhängig sind, empfindlicher reagieren als gesunde Zellen. Letztere sind im Gegensatz zu den Krebszellen zu einer Regeneration fähig [74, 82, 83].

### **1.2.3 Wechselwirkung zwischen HCMV und dem UPS**

Viren besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind eigenständig nicht zur Replikation fähig, weshalb ihre Vermehrung an eine Wirtszelle gebunden ist [84]. Durch Modulationen zellinterner Faktoren schaffen sie optimale Bedingungen für ihre eigene Vermehrung. Zu diesen Modulationen gehört u.a. die Manipulation des UPS.

Bei HCMV verursacht das Tegumentprotein pp71 unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle den Proteasom-abhängigen und Ubiquitin-unabhängigen Abbau des zellulären Transkriptionsrepressors hDaxx und der Tumorsuppressorproteine der sogenannten Pocket-Protein-Familie (pRB, p107 und p130) [85, 86, 87]. Dadurch wird die Expression der *immediate early*-Proteine aktiviert und der lytische Infektionszyklus eingeleitet [88, 89].

Weiterhin nutzt HCMV das UPS, um sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen. Durch HCMV-Proteine US2 und US11 erfolgt die Relokalisation der MHC-Klasse-I-Komplexe der Wirtszelle vom endoplasmatischen Retikulum ins Cytoplasma, wo sie durch das UPS abgebaut werden [90, 91].

Proteasominhibitoren haben im Allgemeinen einen negativen Einfluss auf die virale Replikation. Es wurde bereits gezeigt, dass durch Einsatz von PI eine Blockade der viralen Replikation sowie eine Unterdrückung der Transkription der *immediate early 2 (IE2)* - Gene erfolgt [92, 93, 94]. Die Expression von IE1-Proteinen bleibt dabei unbeeinflusst [93].

## 2 Problemstellung

Bisherige Forschungsergebnisse in dieser Arbeitsgruppe [92] haben gezeigt, dass der Proteasominhibitor MG132 die virale Replikation des HCMV in HELF-Zellen (*human embryonic lung fibroblasts*) inhibiert, sodass weder nicht-infektiöse noch infektiöse virale Partikel gebildet werden.

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, ob eine lytische HCMV-Infektion von Colonkarzinom-Zellen (Caco-2-Zellen) möglich ist und ob Proteasominhibitoren einen Einfluss auf die infizierten Zellen haben.

Eingesetzt werden die Proteasominhibitoren MG132 und Bortezomib. Bortezomib, auch unter dem Herstellernamen Velcade® bekannt, ist ein zytostatisches Arzneimittel, das seit 2004 zur Behandlung des Multiplen Myeloms zum Einsatz kommt [95].

Mittels Bestimmung der *effective concentration 50 %* ( $EC_{50}$ ) soll die antivirale Aktivität von Bortezomib und MG132 analysiert werden. Des Weiteren sollen Wachstumskurven Aufschlüsse über mögliche kausale Zusammenhänge zwischen der Anwesenheit von Proteasominhibitoren und der Freisetzung von infektiösen Viren geben.

Schließlich soll der Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Expression viraler Proteine (sehr frühe, IE1; frühe, pUL44 und späte Proteine pp28) untersucht werden, der anhand von Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analysen dargestellt wird.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Zellen

##### Colon Adenokarzinom Zellen (Caco-2-Zellen)

Caco-2-Zellen ist eine permanente humane Zelllinie, die 1974 aus einem primären Colon Adenokarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes isoliert wurden. Die Caco-2-Zellen stammen von der *European Collection of Cell Cultures* (Nr: 86010202) [96].

##### Humane embryonale Lungenfibroblasten (HEL F301)

HEL F301 ist eine primäre, diploide Zelllinie, die 1990 aus dem Lungengewebe eines abortierten Fötus isoliert wurden. Diese Zelllinie wurde 2014 vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) zertifiziert. Diese Zellen wurden zur Anzucht des Virusstammes AD169 und zur Virustitration verwendet.

#### 3.1.2 Virusstamm

##### HCMV AD169

Der Laborstamm AD169 [97] des humanen Cytomegalievirus wurde von Herrn Dr. med. Christian Sinzger vom Institut für Medizinische Virologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.3 Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Axio-Observer.Z1 – Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 10 – Phasenkontrastmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Branson Sonifier II W-450	Heinemann, Schwaebisch Gmuend
CCD ( <i>charge coupled device</i> )-Kamera Fusion SL	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
CO <sub>2</sub> -Brutschrank - Serie CB	BINDER GmbH, Tuttlingen
Colorview II – Fluoreszenzkamera	Olympus, Tokyo, Japan
Consort EV243 Electrophoresis power supply	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Centrifuge 5417R, Rotor: Fixed-angle rotor FA-45-30-11	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Function Line Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Kleinschüttler KM 2	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Stuart Shaking Incubator SI500	Barloworld Scientific GmbH
TE 70XP Semi-Dry Transfer Unit w/built-in Power Supply	Hofer, San Francisco, CA
TS-100 Thermo Shaker	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex Genic 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wippschüttler/ Taumelgerät	Gasser Apparatebau, Teufen, Schweiz

**Tabelle 1: Geräte.**

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Deckgläschen (Ø = 12 mm)	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Eppendorfgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Eppendorfgefäß 2,0 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Falcon® – Centrifuge Tubes	BD Biosciences AG, Franklin Lakes, USA
Falcon™ – Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences AG, Franklin Lakes, USA
Fusion	Bediensoftware für die CCD-Kamera Fusion SL 4.2 MP
Objektträger (ca. 76 x 26 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Parafilm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Pipetten Eppendorf Reference® (100), Eppendorf Research® (10 und 1000), Eppendorf Research® Plus (200)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Falcon, USA
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Protran BA85 Nitrocellulose Blotting Membrane (Porengröße: 0,45 µm, d = 82 mm)	GE Healthcare Life Sciences
Sterican® – Einmal-Injektionskanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Whatmann-Filterpapier (WM Whatmann 3MM)	GE HEALTHCARE, Freiburg
Zellkulturplatten 24-well, 12-well, 6-well	BD, Heidelberg

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.**

### 3.1.5 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES Puffer) (50 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aceton	JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Acrylamid, 30 % (w/v) Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Steinheim
AMIMED® – DMEM High Glucose (4,5 g/l)	BioConcept GmbH, Allschwil, Schweiz
Ammoniumchlorid (50 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bortezomib	Selleck Chemicals, Houston, USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Complete Tabletten, EDTA-frei (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid, 1:100 in PBS verdünnt)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	BioConcept GmbH, Allschwil, Schweiz
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Lonza, Verviers, Belgien
Ethanol $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fluoprep <sup>TM</sup>	bioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich
Fötales Kälberserum (FKS)	HyClone, Wien/ Perbio Science, Deutschland
Gentamycin	Lonza, Basel, Schweiz
Gentamycinsulfat	Cambrex, Taufkirchen
GlutaMAX <sup>TM</sup> Supplement (100 x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glycerin (Glycerol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol 70 % (v/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
MG132	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM) (10 x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Natriumbicarbonat 7,5 % (w/v)	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Dreieich
Paraformaldehydlösung 3 % (w/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Dreieich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween20)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100 0,2 % (v/v)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Trypsin-EDTA 0,25 % (1 x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

**Tabelle 3: Chemikalien.**

### 3.1.6 Kommerzielle Kits

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
AEC Staining Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

**Tabelle 4: Kommerzielle Kits.**

### 3.1.7 Antikörper

Die primären und sekundären Antikörper wurden bei Immunfluoreszenzfärbungen (IF) in Phosphatpuffer (PBS) und bei Immunoblot-Analysen (IB) in PBS/0,1 % (v/v) Tween20-Lösung verdünnt (siehe Tabelle 3.1.7.1). Für den Plaquereduktionsassay (PA) erfolgten die Verdünnungen der Primärantikörper in PBS und die der Sekundärantikörper in Blocking-Puffer.

Die Primärantikörper wurden bei 4°C gelagert und mehrmals verwendet. Die Sekundärantikörper wurden nach dem erstmaligen Gebrauch verworfen.

#### 3.1.7.1 Monoklonale, primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Einsatz</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
<i>mAb 63-27</i> : Maus-anti-IE1 Antikörper,	für IF: 1:100 für IB: 1:100 für PA: 1:50	Dako, Glostrup, Dänemark
<i>mAb pUL44</i> : „CMV pp52“ Maus-anti-pUL44 Antikörper, sc-69744	für IF: 1: 100 für IB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
<i>mAb pp28</i> : „CMV pp28“ Maus-anti-pp28 Antikörper, sc-56975	für IF: 1:50 für IB: 1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
<i>α-Tubulin</i> : Maus-anti-α-Tubulin Antikörper	für IB: 1:1000	Cell Signaling Technology® Inc., Danvers, MA, USA

**Tabelle 5: Monoklonale Antikörper.**

#### 3.1.7.2 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Einsatz</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Dylight™ 549-konjugiert Ziege Anti-Maus IgG F(ab') <sub>2</sub> Fragment spezifisch	für IF: 1:200	Jackson ImmunoResearch GmbH, West Grove, PA, USA
Polyklonal Hase Anti-Maus Immunglobulin/ HRP-konjugiert	für IB: 1:5000 für PA: 1:500	Dako, Glostrup, Dänemark

**Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.**

### 3.1.8 Proteasominhibitoren

Es wurden Proteasominhibitoren der Klasse der Peptidaldehyde (MG132) und Peptidboronate (Bortezomib) eingesetzt. MG132 wurde in 95 % (v/v) Ethanol und Bortezomib in 100 % (v/v) DMSO gelöst. Die Stammlösung von MG132 (6 mM) wurde bei -20°C, aliquotierte Bortezomib-Stammlösungen (1 mM) wurden dagegen sowohl bei -20°C als auch bei -80°C gelagert. Bei einer Lagerung von -80°C ist Bortezomib lediglich 6 Monate stabil [98].

**Bortezomib: C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>**

(1*R*)-3-Methyl-1-[[[(2*S*)-3-phenyl-2-[(2-pyrazinylcarbonyl)-amino]propanoyl)amino]butyl]borsäure

**MG132: C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>**

Z-Leu-Leu-Leu-CHO

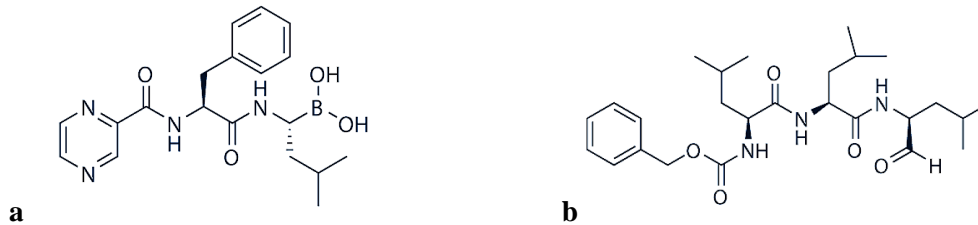


Abb. 7: Schematische Darstellung der verwendeten Proteasominhibitoren. (a) Bortezomib [98], (b) MG132 [99].

### 3.1.9 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

#### 3.1.9.1 Puffer und Lösungen

<i>Puffer/ Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	
<b>Blocking-Puffer</b>	90 ml	PBS
	10 ml	FKS
	0,2 ml	Tween20
<b>Blot-Puffer</b>	500 ml	Ethanol (96 %)
	7,55 g	Tris
	37,5 g	Glycin
	add 2 l A. <i>dest.</i>	
<b>Deionisiertes Wasser</b>	Millipore, Leitfähigkeit: 0,055 µSi/cm, 23°C	
<b>Laemmli-Ladepuffer (6 x)</b>	1,5 M	1M Tris-HCl (pH 6,8)
	13,2 %	SDS
	60 %	Glycerin
	0,06 % (w/v)	Bromphenolblau
	6 %	β-Mercaptoethanol
	add A. <i>dest.</i>	
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung, phoshat buffered saline (PBS)</b>	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	add A. <i>dest.</i>	
	pH 7,4	
<b>PBST (Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,1 % (v/v) Tween20)</b>	0,1 % (v/v)	Tween20
	add PBS	

<b>Sammelgel-Puffer (4 x)</b>	0,5 M 0,4 % (w/v) pH 6,8	Tris-HCl SDS
<b>SDS-Laufpuffer (10 x)</b>	286 g 60,6 g 20 g add 2 l A.dest.	Glycin Tris SDS
<b>Trenngel-Puffer (4 x)</b>	1,5 M 0,4 % (w/v) pH 8,8	Tris-HCl SDS

Tabelle 7: Puffer und Lösungen.

### 3.1.9.2 Zellkulturmedien

<i>Zellkulturmedium</i>	<i>Additive</i>	
<b><i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i></b> <b>für Caco-2-Zellen</b>	25 mM 0,05 mg/ml 2 mM 1 mM	HEPES Gentamycin L-Glutamin Natriumpyruvat
<b><i>Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)</i></b> <b>für HELF Fi301-Zellen</b>	25 mM 0,05 mg/ml 2 mM 1 mM 1 % (w/v)	HEPES Gentamycin L-Glutamin Natriumpyruvat NEAA
<b>Methylzellulose-Kulturmedium (Methocel)</b> <b>mit 0,5 % (w/v) Methylzellulose</b>	0,9 % (v/v) 0,09 % (w/v) 0,05 mg/ml 6,7 % (v/v) 9 % (v/v)	GlutaMax (100x) NaHCO <sub>3</sub> 7,5% (w/v) Gentamycinsulfat FKS MEM (10x)

Tabelle 8: Zellkulturmedien.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Kultivierung von Caco-2- und HELF Fi301-Zellen

Caco-2-Zellen der 20. bis 25. Passage wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in EMEM bzw. bei der Durchführung der Versuche in DMEM Medium (Zusätze siehe 3.1.9.2), bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen einer 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche nach Abnehmen des Mediums mit einer auf 37°C erwärmten



Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) innerhalb von 3-5 min abgelöst und mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen pro ml am Vortag des Versuchsbeginns in 24-Well-, 12-Well oder 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät, sodass der einschichtige Zellrasen zum Versuchsbeginn zu 60 % konfluent ( $\cong$  subkonfluent) war.

HEL F Fi301 wurden zweimal wöchentlich passagiert und in EMEM Medium bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dabei wurden die Zellen bis zur 9. Passage 1:5 und ab der 10. Passage 1:3 in neue 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen umgesetzt. Für die Versuche wurden die Zellpassagen von 10 bis 20 verwendet.

Bevor die Passagierung der HEL F Fi301 in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen oder in 12-Well-Zellkulturplatten erfolgte, wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) abgelöst. Dann wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml in 12-Well-Zellkulturplatten bzw. 1 x 10<sup>6</sup> 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen zwei Tage vor Versuchsbeginn ausgesät, um konfluente Monolayer zu erhalten.

### 3.2.1.2 Anzucht von HCMV

Für die Anzucht des HCMV Laborstammes AD169 wurden konfluente HEL F Fi301 in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Zellzahl: 2 x 10<sup>7</sup>/ Flasche) mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 und einem Infektionsvolumen von 6 ml infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurden 19 ml EMEM mit 10 % FKS hinzugegeben.

Sobald 50 % der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten (ca. 5-6 Tage nach Infektion), wurde das Kulturmedium erneuert. Nach 10 Tagen wurde das virushaltige Medium abgenommen. Die Abtrennung noch vorhandener Zellbestandteile erfolgte durch Sedimentation (3.500 g, 10 min) und anschließender Sterilfiltration (Porengröße = 0,45 µm). Die zellfreie Virussuspension wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3.2.1.3 Experimentelle HCMV-Infektion

Subkonfluente Caco-2-Zellen und konfluente HEL F Fi301 wurden mit dem HCMV Laborstamm AD169 mit unterschiedlicher *multiplicity of infection* (MOI) infiziert (wie angegeben). Dabei erfolgte die Berechnung der MOI [PFU/ Zelle] nach folgender Formel [100, 101]:

$$\text{MOI} = \frac{\text{Volumen(Virus)} \cdot \text{Konzentration(Virus)}}{\text{Volumen(Zellkultur)} \cdot \text{Konzentration (Zellkultur)}} = \frac{V_V \cdot C_V}{V_Z \cdot C_Z}$$

mit:  $C_v$  = Titer des Virus [PFU/ml]  
(Titer des eingesetzten AD169 =  $9,4 \cdot 10^6$  PFU/ml)  
 $C_z$  = Zellzahl pro Vertiefung (Well) [Zellen/ Well]

für Caco-2-Zellen (ca. 60% konfluent):

24-Well-Zellkulturplatten:  $1 \times 10^5$  Zellen/ Well

12-Well-Zellkulturplatten:  $2 \times 10^5$  Zellen/ Well

6-Well-Zellkulturplatten:  $4 \times 10^5$  Zellen/ Well

$V_v$  = Volumen der unverdünnten Virussuspension [ml]

$V_z$  = eingesetztes Infektionsvolumen [ml] (siehe Abschnitt 3.2.1.3)

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Virussuspension in EMEM bzw. DMEM ohne Zusatz von FKS auf die Zellen gegeben und die Kulturen für 1,5 h bei 37°C und 5 %-CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Das zur Infektion eingesetzte Volumen betrug 150 µl für 24-Well-Zellkulturplatten, 300 µl für 12-Well-Zellkulturplatten, 750 µl für 6-Well-Zellkulturplatten. Um eine optimale Virusinfektion zu ermöglichen, wurden die Zellkulturplatten alle 20 min kurz geschwenkt. Die Virussuspension wurde nach Ende der Adsorptionszeit abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden 0,5 ml (24-Well-Zellkulturplatten), 2 ml (12-Well-Zellkulturplatten), 3 ml (6-Well-Zellkulturplatten) des entsprechenden Mediums (wie angegeben) auf die Zellen gegeben.

### 3.2.1.4 Plaquereduktionsassay

#### ***Virustitration***

Die Bestimmung des Titers erfolgte mittels einer geometrischen Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) der Virussuspension in Kulturmedium. Die Infektion der HELF Fi301 erfolgte mit 300 µl Infektionsvolumen der einzelnen Verdünnungsstufen in 12-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $5 \times 10^5$ / Well). Nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Methocel überschichtet und für 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 %-CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Das halb feste Medium Methocel verhindert die Ausbreitung der Viren über das Medium, sodass nur benachbarte Zellen über Zell-Zell-Kontakte infiziert werden können [102].

Sieben Tage nach der Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem Ethanol/Aceton-Gemisch (95:5) für mindestens 20 min bei -20°C fixiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit Blocking-Puffer inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit mAb 63-27 als Primärantikörper gegen IE1 für 1 h bei 37°C. Danach wurden die Zellen 5 x mit PBS gewaschen und für 2 h mit einem HRP-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper bei 37°C inkubiert. Nach erneuten 5 x Waschen der Zellen mit PBS wurden die infizierten Zellen mithilfe des AEC Staining Kits über Nacht bei RT gefärbt. Nach der Abnahme der Färbelösung wurden die Zellen 1 x mit PBS und anschließend einmal mit *Aqua dest.* gewaschen, um nichtgebundene Farbpartikel von den Zellen zu entfernen. Infizierte Zellen zeigten eine Rotfärbung, die mithilfe eines Lichtmikroskops als PFU ausgezählt werden konnten. Ein PFU entsprach dabei mindestens 5 infizierten, benachbarten Zellen.

Der Titer der Virussuspension ergibt sich aus der Anzahl der Plaques ( $n$ ) der höchsten noch positiven Verdünnungsstufe ( $10^{-x}$ ) und des eingesetzten Infektionsvolumens ( $V$ ) nach folgender Formel:  $PFU/ml = n / (10^{-x} \times V)$  [103]. Der endgültige Titer ergibt sich aus der Mittelwertbildung der aus den letzten beiden noch positiven Verdünnungsstufen ermittelten Titer.

### **Bestimmung der EC<sub>50</sub>**

Zur Bestimmung der EC<sub>50</sub> der jeweiligen Proteasominhibitoren in Caco-2-Zellen wurden subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl: 1 x 10<sup>5</sup>/ Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI = 10 infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit steigenden Konzentrationen von PI (Bortezomib, MG132) in Methocel 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Als Kontrolle wurde Methocel ohne Zusatz der PI auf nicht-infizierte (*mock*) und infizierte (*w/o*) Zellen gegeben.

<b>Eingesetzte Konzentrationen von Bortezomib [nM]</b>	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
<b>Eingesetzte Konzentrationen von MG132 [nM]</b>	1	5	10	20	30	40	50

**Tabelle 9: Eingesetzte Konzentrationen der PI zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>.**

Sieben Tage nach Infektion wurden die Plaques angefärbt. Dazu wurden die Zellen mit einem Ethanol/Aceton-Gemisch (95:5) fixiert und immunhistochemisch gefärbt (siehe Virus-titration). Die Auszählung der Plaques erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops. Die Plaquezahl pro Well der jeweiligen PI-Verdünnungsstufe wurde mit der Plaquezahl von *w/o* (entspricht 100 %) ins Verhältnis gesetzt.

### ***Yield Assay***

Mithilfe des Yield Assays wurden Wachstumskurven erstellt. Auf der einen Seite wurde untersucht, welchen Einfluss die PI auf die Bildung infektiöser Viruspartikel und deren Freisetzung aus infizierten Caco-2-Zellen in den extrazellulären Raum besitzen. Dazu wurden die subkonfluenten Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ / Well) mit einer  $MOI = 30$  infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit den Inhibitoren Bortezomib ( $0,25 \text{ nM} \cong EC_{50}(BZ)$ ) bzw. MG132 ( $20 \text{ nM} \cong EC_{50}(MG132)$ ) in DMEM mit 2 % FKS versetzt. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte (*mock*) und mit Virus infizierte (*w/o*) Zellen, die nur mit dem Kulturmedium und ohne PI behandelt wurden. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h p.i. wurden die Überstände abgenommen, um damit neue subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $2 \times 10^5$ / Well) zu infizieren. Die Zellen wurden eineinhalb Stunden mit dem jeweiligen Überstand bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, dann einmal mit PBS gewaschen und mit Methocel überschichtet. Nach sieben-tägiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ -Begasung wurden die Zellen fixiert und die Plaques angefärbt (siehe Virustitration). Die Plaques wurden mittels Lichtmikroskop ausgezählt und das Ergebnis anhand einer Wachstumskurve quantifiziert.

Auf der anderen Seite wurde durch Verwendung eines zellassozierten Virus bei der Infektion im Yield Assay überprüft, ob sich HCMV in den Caco-2-Zellen über Zell-Zell-Kontakte ausbreitet und welchen Einfluss die PI auf diese Art von Verbreitung haben. Auch hier wurden die Caco-2-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ / Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer  $MOI = 30$  infiziert und mit den Inhibitoren Bortezomib ( $0,25 \text{ nM} \cong EC_{50}(BZ)$ ) bzw. MG132 ( $20 \text{ nM} \cong EC_{50}(MG132)$ ) in DMEM mit 2 % FKS inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte (*mock*) und mit Virus infizierte (*w/o*) Zellen, die nur mit dem Kulturmedium und ohne PI behandelt wurden. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h p.i. wurden die Überstände abgenommen und die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) abgelöst. Anschließend wurden die abgenommenen Überstände mit den korrespondierenden, abgelösten Zellen vermischt und auf neue subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $2 \times 10^5$ / Well) gegeben. Die Zellen wurden eineinhalb Stunden mit dem jeweiligen Überstand-Zell-Gemisch bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, dann einmal mit PBS gewaschen und mit Methocel überschichtet. Die Inkubationszeit betrug 7 Tage und wurde bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung im Brutschrank realisiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Plaques angefärbt (siehe Virus-

titration). Nach der lichtmikroskopischen Auszählung erfolgte die Auswertung durch die Erstellung einer Wachstumskurve.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine molekularbiologische Analysemethode, bei der zunächst ein Primärantikörper an das Zielmolekül (Antigen) bindet. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, detektiert [104]. Durch diese Methode können virale Antigene angefärbt werden und damit z.B. als Nachweis einer Virusinfektion der Caco-2-Zellen dienen.

Subkonfluente Caco-2-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ / Well) mit einem Deckgläschen pro Well wurden mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI = 10 infiziert und 7 Tage in mit dem jeweiligen Inhibitor versetzten Medium (DMEM mit 2 % FKS) inkubiert. Die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen betragen 0,25 nM für Bortezomib und 20 nM für MG132. Als Kontrollen dienten Zellen, die nicht infiziert (*mock*) bzw. infiziert (*w/o*) wurden und mit Medium ohne Inhibitor inkubiert wurden.

Nach 7 Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen in den 24-Well-Zellkulturplatten mit einer 3 % Paraformaldehydlösung (w/v) für 20 min bei RT fixiert. Dabei bleibt die zelluläre Struktur erhalten [105]. Nach einem einmaligen Waschschriff mit PBS wurden die Aldehydgruppen des Paraformaldehyds durch eine 10-minütige Inkubation mit 50 mM Ammoniumchlorid blockiert [106]. Damit die Antikörper durch die Zellmembran in das Cytoplasma gelangen können, wurden die Zellen mittels 0,2 % (v/v) Triton X-100 für 5 min permeabilisiert [107]. Anschließend wurden sie zweimal gewaschen und in einer feuchten Kammer für 45 min bei RT mit dem jeweiligen Primärantikörper (20  $\mu$ l pro Deckgläschen) inkubiert. Um nicht-gebundene Primärantikörper zu entfernen, wurden die Deckgläschen einmal mit PBS und einmal mit *Aqua dest.* gewaschen. Im Anschluss wurden die Deckgläschen in einer feuchten und abgedunkelten Kammer mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (Dylight<sup>TM</sup> 549) sowie DAPI inkubiert und nach 30 minütiger Inkubation zweimal mit PBS und einmal mit *Aqua dest.* gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Fluoprep<sup>TM</sup> auf Objektträgern fixiert und nach dem Trocknen mit klarem Nagellack versiegelt. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops.

### 3.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine in einer Gelmatrix auf Polyacrylamidbasis mittels eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Durch die Zugabe des negativ geladenen Detergens SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Außerdem bindet SDS gleichmäßig an die Proteine, sodass sich ein gleiches Verhältnis von Ladung zu Größe des jeweiligen Proteinmoleküls ergibt und die Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht erfolgt [108, 109]. Hier wurde das SDS-PAGE-System nach Laemmli (1970) angewandt. Es handelt sich dabei um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, die sich bezüglich ihres pH-Werts, Ionenstärke und ihrer Porengröße unterscheiden. Im oberen Sammelgel (pH 6,8) werden die aufzutrennenden Proteingemische zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt werden. Der Vorteil gegenüber kontinuierlichen SDS-PAGE-Systemen ist die deutlichere Auftrennung der Proteine [108, 109, 110].

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde hier benutzt, um virale Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und sie nach erfolgtem Transfer vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran immunologisch anzufärben.

Dazu wurden 6-Well-Platten mit subkonfluenten Caco-2-Zellen (Zellzahl:  $4 \times 10^5$ / Well) mit einer MOI = 10 infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit dem jeweiligen in Medium (DMEM mit 2 % FKS) verdünnten Inhibitor (Bortezomib = 0,25 nM, MG132 = 20 nM) versetzt und für 7 Tage im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nicht infiziert (*mock*) bzw. infiziert (*w/o*) und mit Medium ohne Inhibitor inkubiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für die SDS-PAGE vorbereitet: Überstand und abgelöste Zellen wurden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 3.500 g für 3 min sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Sediment in einer Protease-Inhibitor-Lösung (cOmplete, Roche Diagnostics GmbH) mit 1 % (v/v) PMSF resuspendiert, in 1,5 ml-Eppis überführt und bei allen folgenden Schritten auf Eis gelagert. Dann erfolgte eine Sedimentation bei 4.500 g für 3 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und erneut verworfen. Nach einer Resuspension des Sediments in 80 µl Protease-Inhibitor-PMSF-Lösung wurden die Zellen 3 x 15 s bei 4°C sonifiziert und danach bei 20.800 g für 10 min in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge sedimentiert. Vom Überstand wurden 80 µl abgenommen und mit 16 µl Laemmli-Puffer (6 x) gemischt. Das Sediment (Zelltrümmer) wurde verworfen. Bevor die aufzutrennenden Proteine auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie bei 95°C für 5 min im Heizblock gekocht. Das Gel bestand aus einem 10% Trenngel und einem aufgelagerten 4 % Sammelgel. Die beiden Gele wurden nach folgenden Angaben präpariert:

**Sammelgel (4 % Acrylamid): 2 Gele**

2466  $\mu\text{l}$  *Aqua dest.*

1000  $\mu\text{l}$  Sammelgelpuffer

534  $\mu\text{l}$  Acrylamid 30 % (w/v)

**Trenngel (10 % Acrylamid): 2 Gele**

4166  $\mu\text{l}$  *Aqua dest.*

2500  $\mu\text{l}$  Trenngelpuffer

3333  $\mu\text{l}$  Acrylamid 30 % (w/v)

Kurz vor dem Gießen, Zugabe von:

40  $\mu\text{l}$  APS (10 %)

10  $\mu\text{l}$  TEMED

120  $\mu\text{l}$  APS (10 %)

20  $\mu\text{l}$  TEMED

Die Angaben beziehen sich dabei auf die Herstellung von 2 Gelen mit einer Größe von jeweils 5 x 9 cm. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels muss die Induktion der radikalischen Polymerisation durch Zugabe des Polymerisationsinitiators APS und des Polymerisierungskatalysators TEMED gestartet werden.

Im ersten Schritt wird zunächst das Trenngel zwischen zwei durch einen Abstandhalter (*Spacer*) voneinander getrennten Glasplatten gegossen und mit 70 % (v/v) Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels, wird das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit einem zuvor APS und TEMED versetzten Sammelgel überschichtet. Die Höhe des Sammelgels betrug ca. 1,5 cm.

Je nach Anzahl der Proben wurden unterschiedliche Käämme zum Formen der Geltaschen im Sammelgel verwendet. Der Kamm wurde nach Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt. Nach dem Beladen der Geltaschen mit Proteinproben und den Markerproteinen (*PageRuler Prestained Protein Ladder* von Thermo Scientific) wird die Elektrophorese mit 10 mA pro Gel gestartet. Nach Einlauf der Proben in das Trenngel wurde die Stromzahl auf 20 mA pro Gel erhöht.

### 3.2.2.3 Immunoblot

Nach Auftrennung der Proteine im 10 % Polyacrylamidgel der SDS-PAGE wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße: 0,45  $\mu\text{m}$ ) mittels Semi-dry-Verfahren transferiert [111, 112]. Drei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere wurden am Pluspol des Blotting-Gerätes übereinander gelegt. Darauf folgten die Nitrozellulosemembran, das Gel und nochmals drei in Blotpuffer getränkte Filterpapiere. Innerhalb von 55 min wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> auf die Membran (Fläche: 6 x 9 cm) übertragen.

Im Anschluss wurden die Proteine mithilfe spezifischer Antikörper detektiert. Um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler in 5 % (w/v) Milchpulverlösung, die in PBST verdünnt wurde, inkubiert.

Nach einem Waschschrift von 3 x 5 min mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper auf einem Schüttler für 60 min bei RT. Als Kontrolle, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, diente die Färbung mit  $\alpha$ -Tubulin-Antikörper.  $\alpha$ -Tubulin ist Bestandteil der Mikrotubuli, die neben Aktin- und Intermediärfilamenten den Hauptbestandteil des eukaryotischen Zytoskeletts bilden [113].

Nach einem erneuten Waschschrift von 3 x 5 min mit PBST wurde die Membran mit einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT schwenkend inkubiert. Nicht gebundene Sekundärantikörper wurden durch 3 x 5 min Waschen mit PBST entfernt.

Anschließend wurde die Membran mit dem *Pierce ECL Western Blotting Substrate* von Thermo Scientific benetzt. Die *Stable Peroxide Solution* und *Luminol/Enhancer Solution* wurden 1:1 angewendet und sind das chemilumineszente Substrat für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT, wurden die auf diese Weise markierten Proteine mittels eines Chemilumineszenz-Detektors (*CCD Camera Fusion SL*) visualisiert (Einstellung: *Supersensitivity*, 9 min).

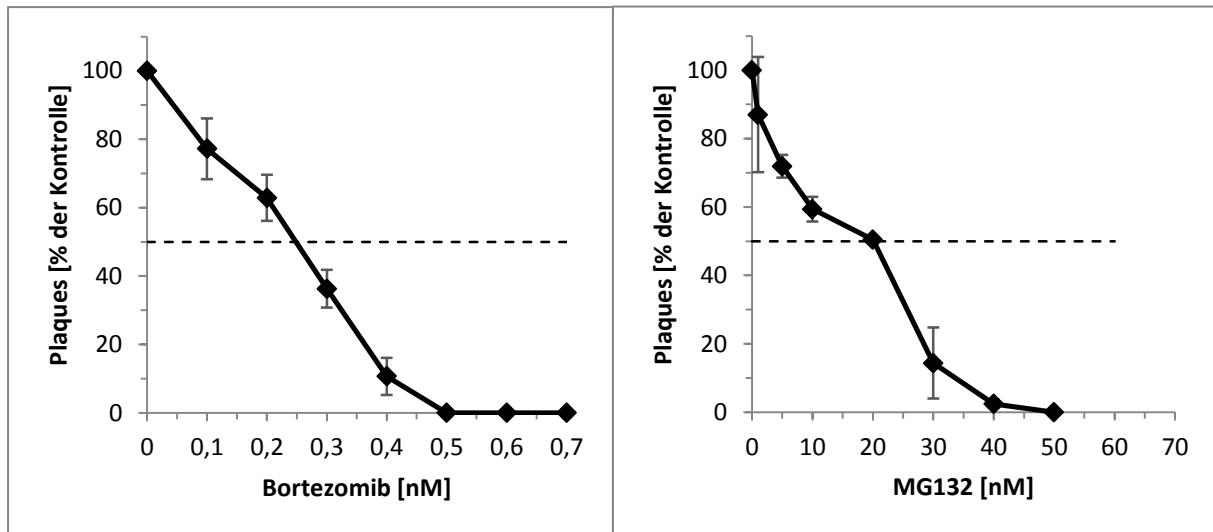


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die HCMV-Replikation

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Proteasomaktivität auf die HCMV-Replikation in Caco-2-Zellen hat, wurden Plaquereduktionsassays mit verschiedenen PI in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt und die  $EC_{50}$  bestimmt. Die  $EC_{50}$  ist die Konzentration einer Substanz (hier des Proteasominhibitors), bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird. In diesem Fall bezieht sich der Effekt auf die antivirale Wirkung der Proteasominhibitoren [114]. Zur Bestimmung der  $EC_{50}$  der jeweiligen Proteasominhibitoren in Caco-2-Zellen wurden subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ / Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI = 10 infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von PI (Bortezomib, MG132) in Methocel 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Als Kontrolle wurde Methocel ohne Zusatz der PI auf nicht-infizierte (*mock*) und infizierte (*w/o*) Zellen gegeben. Nach sieben-tägiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gefärbt (siehe Abschnitt 3.2.1.4) sowie die Plaques lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Plaquezahl pro Well der jeweiligen PI-Verdünnungsstufe wurde mit der Plaquezahl von *w/o* (entspricht 100 %) ins Verhältnis gesetzt.

Anhand Abbildung 8 wird deutlich, dass die HCMV-Replikation mit steigender PI-Konzentration sinkt und ab einer für den jeweiligen PI spezifischen Konzentration gehemmt wird. Die Konzentration, bei der die HCMV-Replikation um 50 % reduziert ist, stellt die *effective concentration 50 %* ( $EC_{50}$ ) dar [115, 116] und kann in der Abbildung 8 aus dem Schnittpunkt der Kurve mit der gestrichelten Linie graphisch bestimmt werden.



**Abb. 8: Einfluss von PI auf die HCMV-Infektion in Caco-2-Zellen.** Subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen wurden mit dem HCMV-Laborstamm AD169 mit einer MOI = 10 infiziert und für 7 Tage mit steigenden Konzentrationen von PI (Bortezomib, MG132) in Methocel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gegen IE1 (*mAb 63-27*) und danach mittels eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (*Polyklonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins HRP*) immunhistochemisch gefärbt. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Plaques bezogen auf die Plaquezahl von *w/o* und deren  $\pm$  Standardabweichungen gegen die steigenden PI-Konzentrationen dargestellt. Die Mittelwerte resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Parallelansätzen. Der Schnittpunkt der Kurve mit der gestrichelten Linie ermöglicht eine graphische Abschätzung der  $EC_{50}$ .

Eine Übersicht der ermittelten  $EC_{50}$  und der während der Projektarbeit ermittelten *cytotoxic concentration 50 %* ( $CC_{50}$ ) werden in folgender Tabelle gezeigt:

Proteasominhibitor	$CC_{50}$ (nM) <sup>3</sup>	$EC_{50}$ (nM) durch Plaquereduktion <sup>2</sup>	SI <sup>1</sup>
<b>Bortezomib</b>	0,83 $\pm$ 0,15	0,25 $\pm$ 0,01	3,32
<b>MG132</b>	45,74 $\pm$ 10,65	20,13 $\pm$ 0,18	2,27

**Tabelle 10: Übersicht der  $CC_{50}$ ,  $EC_{50}$  und der SI der verwendeten PI.**

<sup>1</sup> SI, *selectivity index*.  $SI = CC_{50}/EC_{50}$ .

<sup>2</sup> Die Werte repräsentieren die mittlere  $\pm$  Standardabweichung von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Parallelansätzen.

<sup>3</sup>  $CC_{50}$ -Ermittlung durch Proliferationstest in der Projektarbeit. Die Werte repräsentieren die mittlere  $\pm$  Standardabweichung von vier unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils acht Parallelansätzen.

Aus Abbildung 8 und Tabelle 9 wird erkenntlich, dass die  $EC_{50}$  bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen des jeweiligen PI erreicht wird. Bortezomib erweist sich als effektiverer PI, da ca. eine 80-fach geringere Konzentration gegenüber MG132 ausreicht, um die HCMV-Replikation um 50 % zu hemmen.

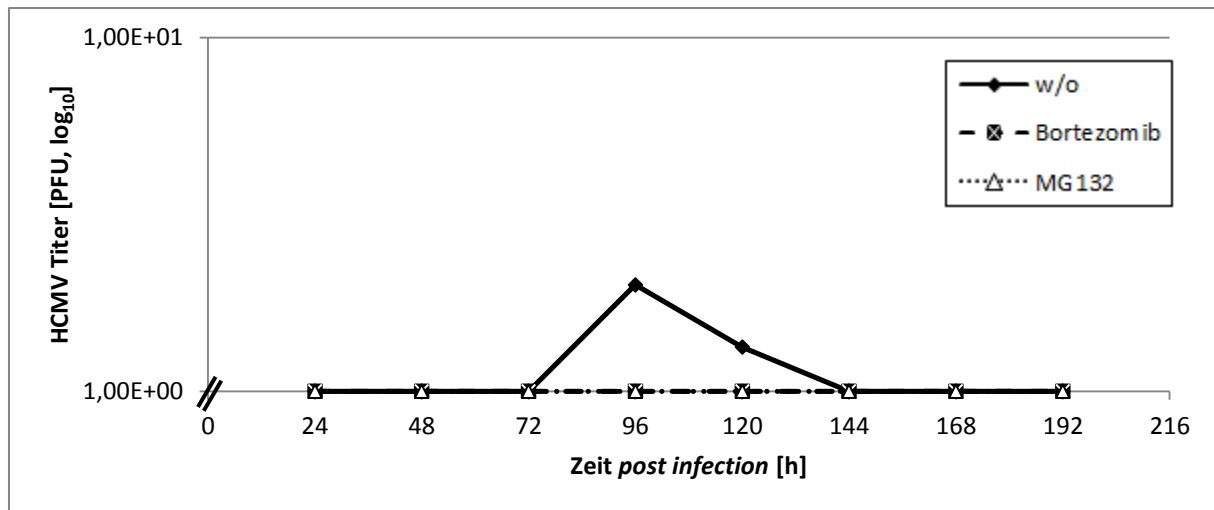
Um den zytotoxischen Effekt der PI deutlicher dazustellen, wird der Selektionsindex durch die Bildung des Quotienten aus  $CC_{50}$  und  $EC_{50}$  ermittelt (siehe Tabelle 9) [116]. Die  $CC_{50}$  ist dabei die Konzentration, bei der die Zellzahl der Caco-2-Zellen um die Hälfte reduziert wird [115, 116]. Die Ergebnisse der SI in Tabelle 9 zeigen, dass die  $CC_{50}$  der verwendeten PI doppelt bis dreifach höher liegen als die  $EC_{50}$ -Werte. Da es sich um sehr niedrige SI-Werte handelt, kann eine Reduktion der HCMV-Replikation durch zytotoxische Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden.

## **4.2 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Virionenfreesetzung**

Wie aus den Ergebnissen aus Abschnitt 4.1 hervorgeht, wird die HCMV-Replikation durch Einwirkung von PI gehemmt. Um der Frage nachzugehen, ob die PI die Bildung infektiöser Viruspartikel und deren Freisetzung aus infizierten Caco-2-Zellen in den extrazellulären Raum beeinflussen, wurden Wachstumskurven anhand eines Yieldassays erstellt.

Subkonfluente Caco-2-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ /Well) wurden mit einer  $MOI = 30$  infiziert und nach der Infektion mit den Inhibitoren Bortezomib ( $0,25 \text{ nM} \triangleq EC_{50}(BZ)$ ) bzw. MG132 ( $20 \text{ nM} \triangleq EC_{50}(MG132)$ ) in DMEM mit 2 % FKS versetzt (siehe Abschnitt 3.2.1.4 Yield Assay). Als Kontrolle dienten nicht-infizierte (*mock*) und mit Virus infizierte (*w/o*) Zellen, die nur mit dem Kulturmedium und ohne PI behandelt wurden. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen, um damit neue subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $2 \times 10^5$ /Well) zu infizieren. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Methocel überschichtet und 7 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert. Anschließend wurden die Plaques angefärbt und mittels Lichtmikroskop ausgezählt (siehe Abschnitt 3.2.1.4). Das Ergebnis wurde anhand einer Wachstumskurve quantifiziert (siehe Abb. 9).

Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden nach der Übertragung der Überstände auf die 12-Well-Zellkulturplatten lediglich zu den Zeiten 96 h und 120 h p.i. vereinzelt Plaques bei *w/o* gebildet. Bei den mit PI behandelten Zellen konnten zu den getesteten Zeitpunkten weder Plaques noch infizierte Einzelzellen entdeckt werden.



**Abb. 9: Wachstumskurve des Laborstammes AD169 in subkonfluent gewachsenen Caco-2-Zellen nach Inkubation mit den verwendeten PI (Bortezomib, MG132) mittels Yieldassay.** Subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen wurden mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI = 30 infiziert. Anschließend wurden die Zellen unter Einwirkung von Bortezomib (0,25 nM), MG132 (20 nM) oder Kulturmedium (*w/o*) bei 37°C inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h und 192 h p.i. wurden mittels der abgenommenen Überstände neue Caco-2-Zellen infiziert und anschließend mit Methocel überschichtet. Nach siebentägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch angefärbt. Die  $\pm$  Standardabweichung resultiert aus einem Experiment mit 3 Parallelansätzen.

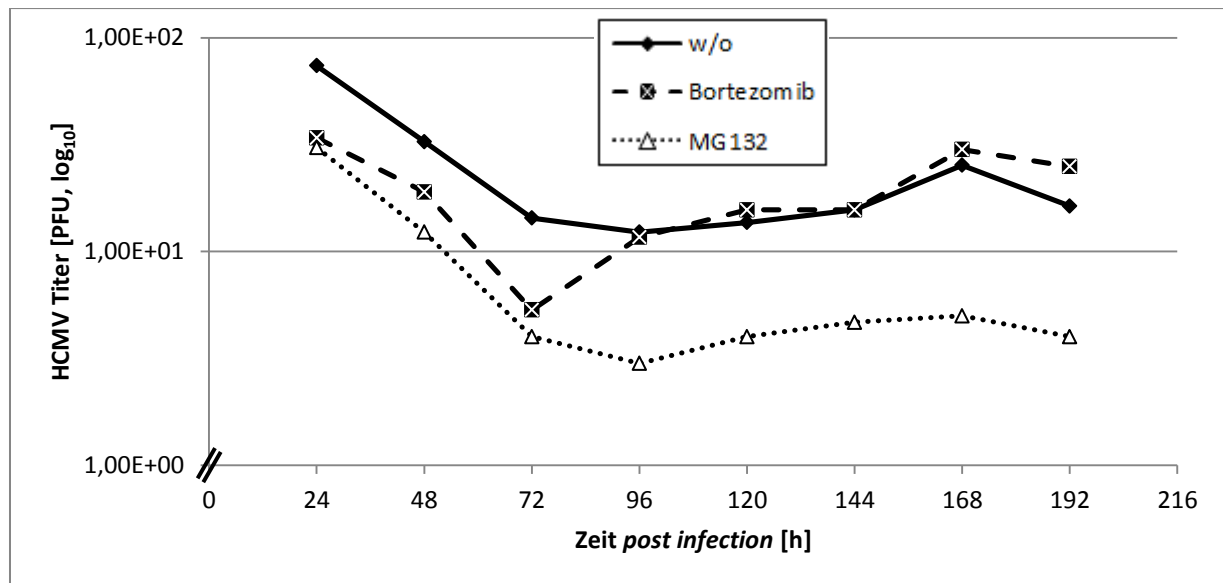
### 4.3 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Verbreitung von HCMV über Zell-Zell-Kontakte

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ausbreitung von HCMV in Epithel- und Endothelzellen bei einer akuten Infektion vorwiegend über Zell-Zell-Kontakte erfolgt [12, 117]. Um diese Gegebenheiten in Caco-2-Zellen zu überprüfen und um den Einfluss von PI auf diese Art von Verbreitung zu untersuchen, wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt, bei dem die Caco-2-Zellen mit zellassoziertem Virus infiziert wurden.

Wie bei der Erstellung der Wachstumskurve im Abschnitt 4.2 wurde die Infektion der Caco-2-Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ /Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI = 30 durchgeführt. Danach wurden die infizierten Zellen mit den Inhibitoren Bortezomib (0,25 nM  $\cong$  EC<sub>50</sub>(BZ)) bzw. MG132 (20 nM  $\cong$  EC<sub>50</sub>(MG132)) in DMEM mit 2 % FKS inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte (*mock*) und mit Virus infizierte (*w/o*) Zellen, die nur mit dem Kulturmedium und ohne PI behandelt wurden.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Überstände abgenommen und die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) abgelöst. Auf neue subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $2 \times 10^5$ /Well) wurden die abgenommenen Überstände, die mit den korrespondierenden, abgelösten Zellen vermischt wurden, gegeben. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Methocel überschichtet und 7 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-

Begasung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Plaques angefärbt (siehe 3.2.1.4). Nach der lichtmikroskopischen Auszählung der Plaques wurden diese logarithmisch gegen die Zeitpunkte, zu denen die Überstände und Zellen abgenommen wurden, aufgetragen (siehe Abb. 10).



**Abb. 10: Einfluss von PI auf die HCMV-Verbreitung über Zell-Zell-Kontakte in Caco-2-Zellen.** Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI = 30 infiziert und danach mit Bortezomib (0,25 nM), MG132 (20 nM) bzw. mit Kulturmedium (*w/o*) versetzt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Überstände und deren Zellen abgenommen und vermischt, um damit neue Caco-2-Zellen zu infizieren. Nach siebentägiger Inkubation wurde die Anzahl der Plaques bestimmt. Die dargestellten Mittelwerte und deren  $\pm$  Standardabweichung ergeben sich aus einem durchgeführten Experiment mit jeweils 3 Parallelansätzen.

Alle dargestellten Verläufe der Wachstumskurven in Abbildung 10 zeigen zunächst eine Reduktion der Plaquezahl, um danach wieder anzusteigen und einen relativ konstanten Verlauf zu zeigen. Es wird ersichtlich, dass bei den infizierten mit PI behandelten Zellen bereits nach 24 h Inkubation eine drastische Reduktion der Virusverbreitung stattfand.

Bei den mit den PI Bortezomib bzw. MG132 behandelten, infizierten Zellen war nach 24 h p.i. nur ca. die Hälfte der Plaquezahl im Vergleich zur *w/o*-Kontrolle nachweisbar. Nach 72 h p.i. steigt die Zahl der freigesetzten Virionen bei den mit Bortezomib behandelten Zellen deutlich an und zeigt nach 96 h p.i. keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (*w/o*). Die Anzahl der freigesetzten Virionen der mit MG132 behandelten, infizierten Zellen sinkt nach 96 h auf ein Viertel der *w/o*-Kontrolle. Dieses Verhältnis bleibt auch im weiteren Verlauf der dargestellten Kurven gekennzeichnet durch einen leichten Anstieg relativ konstant.

#### **4.4 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die virale Proteinexpression**

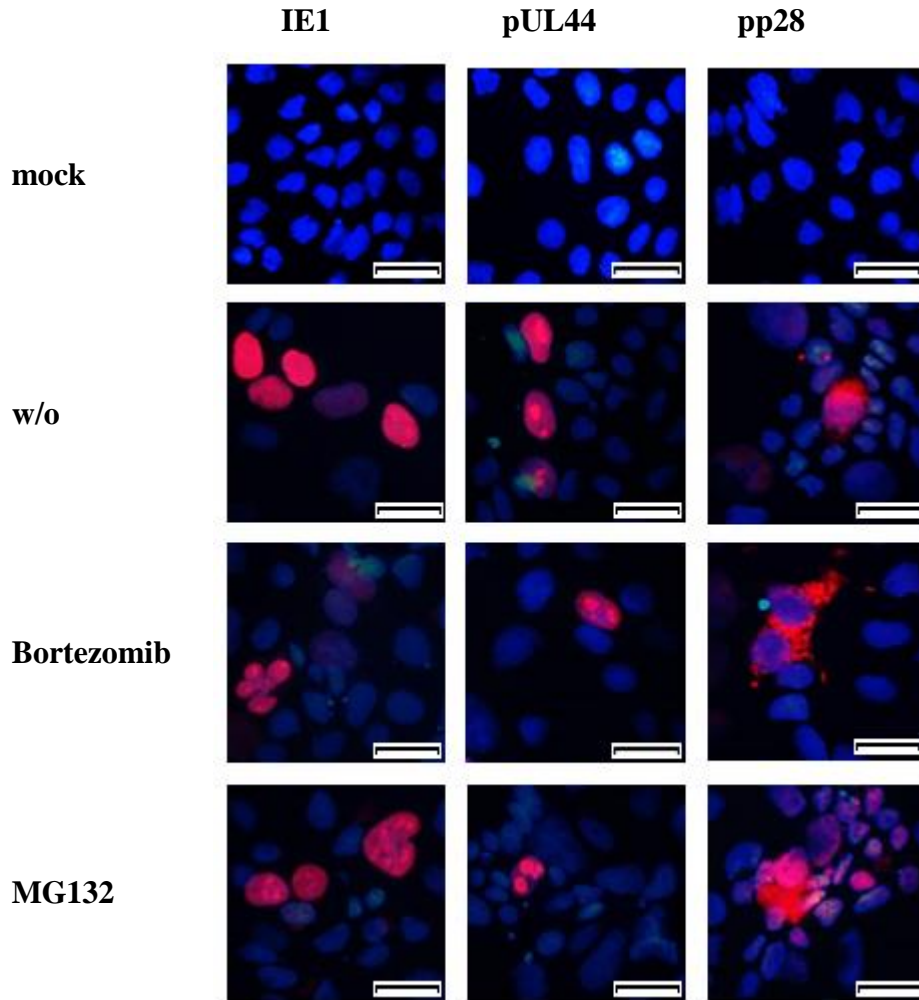
Der Effekt von PI auf die virale Proteinsynthese wurde anhand zweier unterschiedlicher Methoden charakterisiert. Dabei wurde die Expression von IE1 (ein *immediate-early* Protein), pUL44 (ein *early* Protein) und pp28 (ein *late* Protein) sowohl in der Immunfluoreszenz als auch mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot untersucht.

##### **4.4.1 Analyse der Proteinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Subkonfluente Caco-2-Zellen auf DG (1 DG/Well) in 24-Well-Zellkulturplatten (Zellzahl:  $1 \times 10^5$ / Well) wurden mit AD169 mit einer MOI = 10 infiziert und 7 Tage mit dem jeweiligen Inhibitor (BZ = 0,25 nM und MG132 = 20 nM) versetzten Medium (DMEM mit 2 % FKS) inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nicht infiziert (*mock*) bzw. infiziert (*w/o*) und mit Medium ohne Inhibitor inkubiert wurden.

Nach 7 Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen auf den DG in den 24-Well-Zellkulturplatten fixiert (siehe Abschnitt 3.2.2.1) und zuerst mit den Primärantikörpern (mAb 63-27 gegen IE1, mAb pUL44 gegen pUL44, mAb pp28 gegen pp28) und anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (Dylight<sup>TM</sup> 549) gefärbt. Um die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop über die Färbung der DNA sichtbar zu machen, wurde in der Inkubation mit dem 2. Antikörper DAPI zugesetzt. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops, wobei Fotos mithilfe einer Digitalkamera und der Cell D Software (Olympus) aufgenommen wurden.

In Abbildung 11 zeigen sowohl die Kontrolle (*w/o*) als auch die mit PI behandelten, infizierten Zellen keinen Einfluss auf die Expression der dargestellten Proteine, die neben Proteinen für die sehr frühe Phase (IE1) bzw. die virale Replikation (pUL44) das späte Strukturprotein (pp28) umfasst.

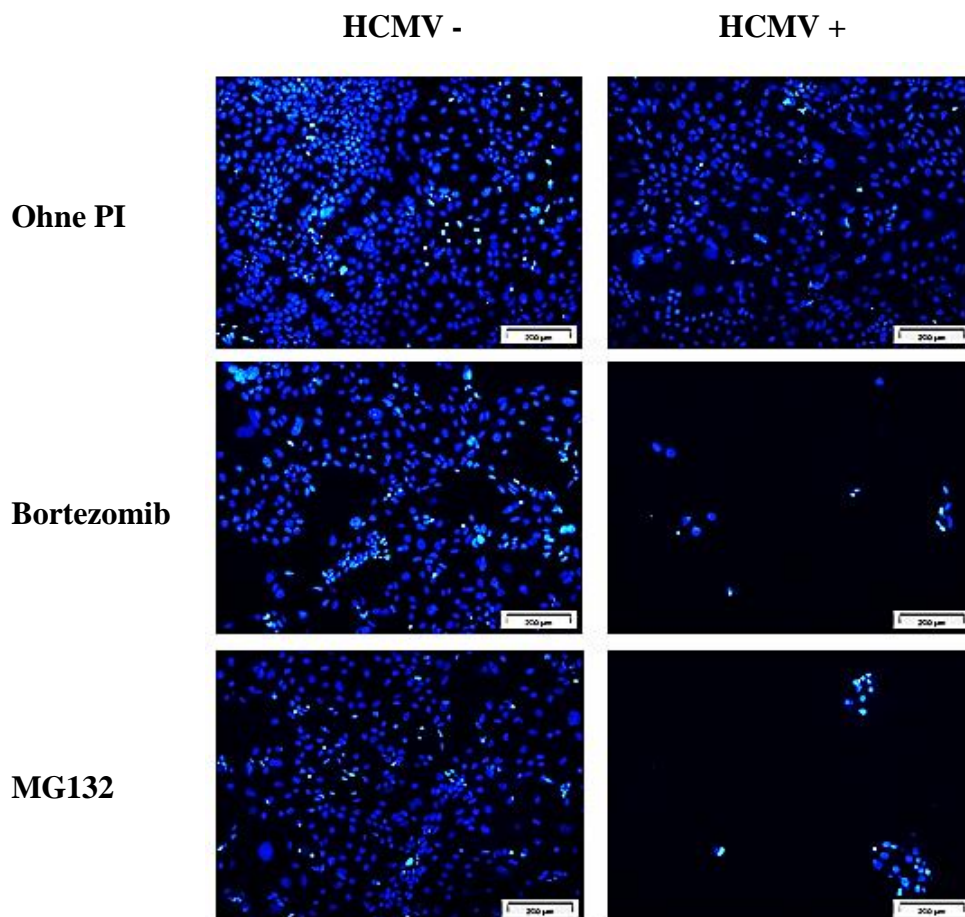


**Abb. 11: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz.** Auf Deckgläsern subkonfluent gewachsene Caco-2-Zellen wurden mit AD169 mit einer MOI = 10 infiziert und mit Bortezomib (0,25 nM) und MG132 (20 nM) inkubiert. Als Kontrollen wurden nicht-infizierte (*mock*) bzw. infizierte (*w/o*) Zellen mit Kulturmedium ohne PI versetzt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen auf die viralen Proteine IE1, pUL44 und pp28 mittels Antikörperfärbung und Immunfluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Färbung der Zellkern-DNA wurde DAPI eingesetzt. Die Bilder der Antikörper (rot) bzw. der DAPI-Färbung (blau) wurden anschließend mithilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP übereinander gelegt (*merged*). Die Fotos wurden mit einer 40 x Vergrößerung im Mikroskop aufgenommen. Der Größenbalken entspricht einer Größe von 50  $\mu\text{m}$ .

Zusätzlich zur viralen Proteinexpression wurde ebenfalls der mögliche zytotoxische Einfluss der HCMV-Infektion auf die mit PI behandelten Caco-2-Zellen untersucht.

In Abbildung 12 sind die DAPI-Färbungen der nicht-infizierten bzw. mit AD169 infizierten und mit PI behandelten Caco-2-Zellen dargestellt. Die Konzentrationsangabe der PI entspricht der jeweiligen in der Projektarbeit ermittelten  $CC_{50}$  (Bortezomib = 0,8 nM, MG132 = 45 nM (siehe Tabelle 9)). Die nicht-infizierten Zellen zeigen durch die PI-Behandlung zu der jeweiligen  $CC_{50}$  eine Reduktion von ca. 50%, wohingegen die infizierten Zellen deutlich stärker in ihrer Zellzahl reduziert werden.

Der zytotoxische Effekt der PI in Bezug auf die Caco-2-Zellen tritt bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen tritt auf. Dabei hat offensichtlich die HCMV-Infektion der Zellen einen erheblichen Einfluss auf die Reduktion der Zellzahl.



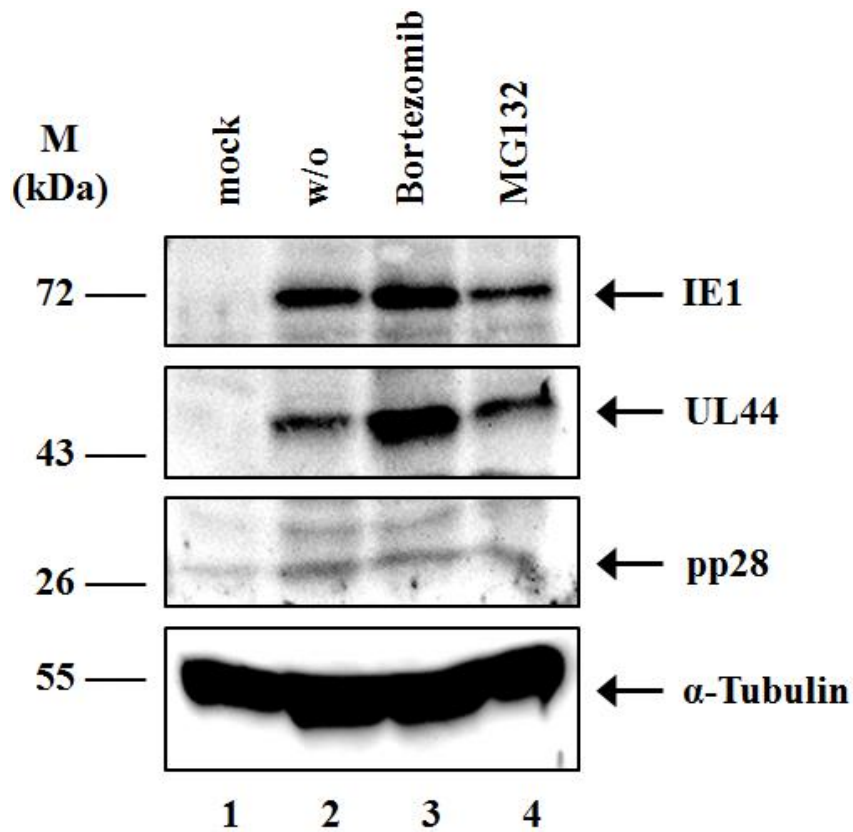
**Abb. 12: Einfluss von HCMV und der PI auf die Reduktion der Zellzahl von Caco-2-Zellen.** Subkonfluente infizierte bzw. nicht-infizierte Caco-2-Zellen auf Deckgläsern wurden 7 Tage mit Bortezomib (0,8 nM), MG132 (45nM) oder nur mit Kulturmedium (ohne PI) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch DAPI angefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskop bei 10 x Vergrößerung begutachtet. Der Größenbalken entspricht einer Größe von 200 µm.



#### 4.4.2 Analyse der Proteinexpression mittels Immunoblot

Subkonfluente Caco-2-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten wurden mit AD169 mit einer MOI = 10 infiziert und 7 Tage mit Bortezomib (0,25 nM), MG132 (20 nM) bzw. nur mit Kulturmedium (*w/o*) inkubiert. Als weitere Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen (*mock*). Sieben Tage nach der Infektion wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Proteine mittels SDS-PAGE in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Danach erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und eine Antikörperfärbung gegen die *immediate early* (mAb 63-27 gegen IE1 (72 kDa)), *early* (mAbpUL44 gegen pUL44 (52 kDa)) bzw. *late* (mAbpp28 gegen pp28 (28 kDa)) Proteine. Als Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (55 kDa) eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.2.3). Die Detektion der Proteine erfolgte mittels einer CCD-Kamera.

Die Ergebnisse zeigen zunächst, dass identische Proteinmengen in allen Spuren vorhanden waren (siehe Abb. 13, Spuren 1-3). Weiterhin wurde die Expression der viralen Proteine IE1 und pUL44 sowohl in der Kontrolle *w/o* (siehe Abb. 13, Spur 2) als auch in den mit den PI behandelten, infizierten Zellen (siehe Abb. 13, Spur 3-4) detektiert. Durch Überladung von  $\alpha$ -Tubulin in allen Spuren 1-4 ist eine genaue Quantifizierung der viralen Proteine nicht möglich. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz (siehe Abschnitt 3.4.1) konnte pp28 sowohl in den mit PI behandelten, infizierten Zellen als auch in der Kontrolle *w/o* nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auf der Membran waren unspezifische Bindungen des Antikörpers zu erkennen (siehe Abschnitt 10.4 im Anhang).



**Abb. 13: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot.** Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit AD169 mit einer MOI = 10 infiziert und mit Bortezomib (0,25 nM), MG132 (20 nM) bzw. mit Kulturmedium ohne PI (*w/o*) inkubiert. Nicht-infizierte Zellen wurden ebenfalls mit Kulturmedium (*mock*) versetzt. Nach Auftrennung der Proteine in einem 10%igen Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Immunoblot mit Antikörpern gegen IE1, pUL44 und pp28 detektiert. Die Ladungskontrolle erfolgte durch die Färbung gegen das zelluläre Protein  $\alpha$ -Tubulin. Die Markerproteine sind auf der linken Seite, die Proteine auf der rechten Seite dargestellt.

## 5 Diskussion

Die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) eukaryotischer Zellen besteht im Wesentlichen in der Degradation falsch gefalteter, defekter sowie regulatorischer Proteine. Besonders durch den Abbau regulatorischer Proteine kommt dem UPS eine bedeutende Rolle in der Steuerung vieler grundlegender zellulärer Prozesse wie Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Apoptose, DNA-Reparatur und Antigenrepräsentation [59, 60, 61, 82] sowohl in normalen als auch in Tumorzellen zu.

In Tumorzellen ist das UPS aufgrund ihrer erhöhten Zellproliferation und des damit ebenfalls erhöhten Stoffwechsels übermäßig aktiv [82]. Es wird angenommen, dass dies ein Grund darstellt, warum Tumorzellen empfindlicher auf die Proteasominhibition als normale Zellen [82]. Des Weiteren nutzen auch Viren das UPS, um die verschiedenen Stadien ihrer lytischen Infektion zu ermöglichen [118, 119, 120]. Viren stellen keine eigenständigen Lebewesen dar und sind im Zusammenhang mit ihrer Replikation auf den Stoffwechsel einer Wirtszelle angewiesen [84]. Sie haben daher eine Vielzahl verschiedenster Strategien entwickelt, um zelluläre Prozesse zugunsten ihrer eigenen Vermehrung zu beeinflussen [85, 89]. Zu ihnen zählt auch das humane Cytomegalievirus (HCMV), das schwerwiegende Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten hervorrufen kann [2]. Eine HCMV-Infektion gehört zur häufigsten kongenitalen Virusinfektion und kann zur Schädigung des Fötus führen [13, 14]. Bereits in früheren Studien wurde die Wichtigkeit des UPS für die HCMV-Replikation in HELF durch die Verwendung von PI bestätigt [92, 93]. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Caco-2-Zellen grundsätzlich mit HCMV infizieren lassen und welche grundlegende Rolle das UPS durch Zugabe von PI (Bortezomib, MG132) für die HCMV-Replikation in Colonkarzinom-Zellen (Caco-2-Zellen) hat.

### ***5.1 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die HCMV-Replikation***

Um den Einfluss des UPS auf die HCMV-Replikation in infizierten Caco-2-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit steigenden PI-Konzentrationen (Bortezomib, MG132) versetzt und der Selektionsindex (SI) für jeden Inhibitor ermittelt (siehe Abschnitt 4.1). SI kennzeichnet den zytotoxischen Effekt der PI auf die Caco-2-Zellen. Er ergibt sich aus dem Verhältnis der 50%igen zytotoxischen Konzentration ( $CC_{50}$ ) zur 50%igen effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) [116].

Im Allgemeinen wurde die HCMV-Replikation mit steigender PI-Konzentration verringert, was durch die Reduktion der Plaqueanzahl verdeutlicht wurde (siehe Abb. 8). Durch Einsatz

von PI konnte daher ein antiviraler Effekt erreicht werden. Bortezomib mit einer  $EC_{50}$  von  $0,25 \text{ nM} \pm 0,01 \text{ nM}$  ist ca. 80 mal effektiver als MG132 mit einer  $EC_{50}$  von  $20,13 \text{ nM} \pm 0,18 \text{ nM}$ , um die Plaquezahl der HCMV-infizierten Caco-2-Zellen um 50 % zu vermindern (siehe Tabelle 10). Diese Werte weisen darauf hin, dass der Effekt der PI auf die Caco-2-Zellen ebenfalls die HCMV-Infektion beeinflusst, was sich in einer Verringerung der Produktion infektiöser Virionen äußert. Zum einen könnte dies durch die Hemmung des UPS ausgelöst werden, welche sich negativ auf die HCMV Replikation in der Zelle auswirkt. Andererseits könnte es sich auch um einen Nebeneffekt handeln, der durch zytotoxische Effekte der PI hervorgerufen wird. Denn die ermittelten SI-Werte ergeben sowohl für Bortezomib als auch für MG132 in den HCMV-infizierten Caco-2-Zellen im Gegensatz zu anderen Zelllinien relativ niedrige Werte. Die  $CC_{50}$  von Bortezomib ( $0,83 \text{ nM} \pm 0,15 \text{ nM}$ ) liegt doppelt und die von MG132 ( $45,74 \text{ nM} \pm 10,65 \text{ nM}$ ) dreifach höher als die jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte (siehe Tabelle 10). Im Vergleich zu mit HCMV-infizierten embryonalen Lungenfibroblasten (HELFL) beträgt der SI-Wert für MG132 einen dreimal höheren Wert als der in infizierten Caco-2-Zellen [92]. Aus diesem Grund sollte auch die Reduktion der HCMV-Replikation durch zytotoxische Effekte in Betracht gezogen werden.

## ***5.2 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die Virionenfreesetzung***

Durch Untersuchung der Überstände infizierter Caco-2-Zellen zu verschiedenen Zeiten mittels Plaquereduktionsassays (siehe Abschnitt 4.2) konnte die Permissivität dieser Zellen für HCMV charakterisiert werden, d.h. ob eine Bildung infektiöser HCMV-Partikel stattfinden konnte.

Es wurden weder Plaques noch infizierte Einzelzellen in den mit PI behandelten bzw. unbehandelten Überständen gesichtet. Eine Ausnahme stellen die Zeiten 96 h und 120 h dar, in denen vereinzelt Plaques bei *w/o* gebildet wurden (siehe Abb. 9). Da bereits aus der Literatur sowie aus Vorversuchen hervorgegangen ist, dass sich die Caco-2-Zellen schwer und nur mit einer hohen MOI ( $MOI > 1$ ) infizieren lassen [121], könnte es daran liegen, dass nicht genug Virionen ins Kulturmedium freigesetzt wurden und damit die MOI zu niedrig war, um die Caco-2-Zellen in den 12-Well-Zellkulturplatten zu infizieren. Eventuell sollte eine noch höhere Anfangs-MOI als 30 angewendet werden, damit mehr Virionen in das Kulturmedium freigesetzt werden. Ein weiterer Grund der nicht erfolgten Virionenfreesetzung könnte sein, dass es zu keiner vollständigen Ausbildung infektiöser Viruspartikel in den Caco-2-Zellen kam und sie gegebenenfalls ab einem gewissen Schritt innerhalb des lytischen HCMV-

Infektionszyklus abbrach. In diesem Fall wären die Caco-2-Zellen nicht permissiv für eine Infektion durch HCMV.

Zur Verbesserung der Infektion wurde in Vorversuchen bereits die Vorbehandlung der Zellen mit der kurzkettigen Fettsäure Natriumbutyrat (NaB, 0,5-2 mM) getestet. Laut Radsak *et al.* 1989 [122] wurde durch die Behandlung mit 1-2 mM NaB die Permissivität für HCMV in Endothelzellen verbessert. Leider erwies sich diese Vorbehandlung der subkonfluenten Caco-2-Zellen als sehr zytotoxisch und wurde aus diesem Grund in den Experimenten nicht verwendet. Eventuell könnten geringere NaB-Konzentrationen als die getesteten verwendet werden, um die genannte Zytotoxizität zu umgehen, wobei dann auch getestet werden müsste, ob diese Konzentration dann noch ausreichend ist, um die Permissivität der Zellen zu verbessern.

Weiterhin wäre die Untersuchung der HCMV-Infektion durch Anwendung eines klinischen Isolats interessant. Der Wirtstropismus des Laborstammes AD169 wurde durch die mehrmalige Passagierung auf humane Fibroblastenzellen (HF) drastisch limitiert [123, 124]. Eventuell ist AD169 nicht mehr in der Lage, die Caco-2-Zellen effektiv zu infizieren, was sich durch die Notwendigkeit einer hohen MOI für die Infektion andeuten lässt. Die Bildung infektiöser HCMV-Partikel sowie der Einfluss der PI auf die Virionenfreesetzung konnte mittels dieser Methode und den genannten Bedingungen (siehe Abschnitt 4.2) nicht charakterisiert werden.

### **5.3 Einfluss der Proteasomihhibitoren auf die Verbreitung von HCMV über Zell-Zell-Kontakte**

Laut Literatur [12, 117] (siehe Abschnitt 4.3) erfolgt die Ausbreitung von HCMV in Epithel- und Endothelzellen vorwiegend über Zell-Zell-Kontakte. Sowohl aus diesem Grund als auch im Hinblick auf die nicht vorhandene oder ungenügende Virionenfreesetzung in das Kulturmedium in Abschnitt 4.2 bzw. 5.2 wurde in diesem Experiment die Infektion der Caco-2-Zellen mit einem zellassoziertem HCMV durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3). Mit diesem Experiment konnte die Virusverbreitung über Zell-Zell-Kontakte bestätigt werden. Die Verwendung von zellassoziertem HCMV ist somit eine gute Alternative, um die Infektion der Caco-2-Zellen zu verbessern und um die antivirale Wirksamkeit der PI in den HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu untersuchen.

Als Ergebnis konnte eine Plaquereduktion um ca. 50 % der mit den PI Bortezomib bzw. MG132 behandelten, infizierten Zellen nach bereits 24 h p.i. im Vergleich zur *w/o*-Kontrolle

nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Die nachgewiesene Virusverbreitung bereits 24 h nach Infektion mit dem Überstand-Zell-Gemisch deutet darauf hin, dass schon sehr frühe HCMV-Proteine (in diesem Fall IE1) durch Zell-Zell-Kontakte übertragen wurden [12]. Eventuell könnten die Proteine auch noch Virionen der Ursprungsinfektion stammen, die durch das Waschen mit PBS nach der Infektion nicht von den Zellen abgelöst wurden. Ein Replikationszyklus des HCMV dauert ca. 72 h [6].

MG132 erwies sich als stabilerer PI gegenüber Bortezomib, da nach 72 h die Plaquezahl bei den mit Bortezomib behandelten Zellen anstieg und nach 96 h p.i. identisch mit der ohne PI behandelten Kontrolle (*w/o*) war. Bei der zytostatischen Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom wird Bortezomib alle 72 h in den ersten beiden Wochen des Behandlungszyklus verabreicht [125]. Möglicherweise lässt die Wirksamkeit von Bortezomib nach 72 h p.i. auch *in vitro* nach. Diese Vermutung könnte durch zusätzliche Zugabe des Inhibitors nach 72 h p.i. *in vitro* oder durch eine Bestimmung der Proteasomaktivität in den Caco-2-Zellen aufgeklärt werden. Allerdings spielen *in vivo* die Metabolisierung des Therapeutikums sowie dessen Ausscheidung aus dem Körper eine weitere Rolle. Dieser Effekt der Instabilität im Verlauf der Infektion ist bei der Ermittlung der  $EC_{50}$  nicht aufgetreten. Es könnte daran liegen, dass dort mit einer wesentlich niedrigeren MOI (MOI = 10) im Vergleich zu diesem Experiment (MOI = 30) gearbeitet wurde und die unterschiedliche Viruskonzentration eine Rolle spielt.

Nach 96 h p.i. und auch im weiteren Verlauf wird die Anzahl der Plaques der mit MG132 behandelten, infizierten Zellen auf ein Viertel der *w/o*-Kontrolle reduziert.

Auffallend ist außerdem, dass sowohl bei unbehandelten als auch bei PI behandelten infizierten Zellen die PFU/ml Werte von 24 h p.i. zu 72 h p.i. deutlich sinken. Eventuell reichte das einmalige Waschen der Zellen mit PBS nach der Infektion nicht aus, um die restlichen zellassoziierten Virionen aus der Ursprungsinfektion zu entfernen.

#### **5.4 Einfluss der Proteasominhibitoren auf die virale Proteinexpression**

Mittels Immunfluoreszenz erfolgte die Untersuchung der Expression viraler Proteine. Bei einer Infektion mit einer MOI = 10 konnte nach 7 d p.i. die Expression aller untersuchten *immediate early* (IE1), *early* (UL44) und *late* (pp28) Proteine in den sowohl mit PI behandelten als auch unbehandelten Caco-2-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 11). Bortezomib sowie MG132 führen somit nicht zur Inhibition der Expression der untersuchten viralen Proteine in den mit HCMV-infizierten Caco-2-Zellen. Die Kontrolle der nicht-

infizierten Zellen (*mock*) zeigt, wie erwartet, keine Expression der viralen Proteine. Die bereits im Abschnitt 4.3 gezeigte Permissivität konnte demnach in der Immunfluoreszenz von der Bildung des *immediate early* Proteins IE1 bis zum *late* Protein pp28 bestätigt werden. Der Einfluss der PI auf die HCMV-Infektion konnte in der Immunfluoreszenz aufgrund der sehr unregelmäßig verteilten Infektion innerhalb des Zellrasens nicht ermittelt werden. Bei einer gleichmäßigen Infektion des Zellrasens hätte eine Quantifizierung der HCMV-Proteine exprimierenden Zellen mit und ohne Inhibitorbehandlung Aufschluss über dessen Einfluss auf die HCMV-Infektion gegeben.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben dem zytotoxischen Effekt der PI offensichtlich auch die HCMV-Infektion in den Caco-2-Zellen zur Hemmung der Zellproliferation sowie zur Reduktion der Zellzahl beiträgt (siehe Abb. 12). Zu den jeweiligen  $CC_{50}$ -Konzentrationen zeigten die mit AD169 (MOI = 10) infizierten Caco-2-Zellen eine stärkere Reduktion der Zellzahl als die nicht-infizierten Caco-2-Zellen (siehe Abb. 12). In HELF Fi301 wurde bereits dargelegt, dass HCMV in der Lage ist, den Zellzyklus der Wirtszelle in der späten  $G_1$ -Phase beim Übergang zur S-Phase zu arretieren [126, 127, 128]. Damit wird die Zellproliferation dieser Zellen inhibiert.

Zusätzlich zum Nachweis der viralen Proteinexpression in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen durch Immunfluoreszenz sollten diese ebenfalls durch Immunoblot detektiert werden. Dies erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der Nachweis durch Immunfluoreszenz (MOI = 10, 7 d p.i.). Sowohl in der Kontrolle *w/o* als auch in den mit den PI behandelten, infizierten Zellen konnte die Expression der viralen Proteine IE1 und pUL44 nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Bei den mit Bortezomib behandelten, infizierten Zellen wurde die Expression der letzten beiden genannten Proteine im Vergleich zur *w/o* Kontrolle anscheinend verstärkt. Allerdings kann mithilfe des Immunoblots keine genaue Quantifizierung der einzelnen Proteinkonzentrationen vorgenommen werden. Zum einen ist diese Methode nicht sensitiv genug. Zum anderen kann die genaue Proteinmenge aller Proben aufgrund der hier sehr starken  $\alpha$ -Tubulin-Banden nicht ermittelt werden. Vergleiche mit unterschiedlichen MOIs sind zusätzlich notwendig, um den Einfluss der PI auf die virale Proteinexpression zu quantifizieren. Eine aussagekräftige Methode der Quantifizierung wäre eine quantitative real-time PCR [129], deren Etablierung im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht möglich war.

Das *late* Protein pp28 konnte nicht eindeutig detektiert werden. Möglicherweise könnte eine sehr geringe Konzentration an pp28 in den scheinbar auf der richtigen Höhe laufenden Proteinbanden des Immunoblots enthalten sein, da dieses Protein ebenfalls in der Immun-

fluoreszenz nachgewiesen wurde. Um eine bessere Auftrennung der Proteine der Größen 10 bis 34 kDa zu gewährleisten, könnte eine höhere Acrylamidmenge im Sammelgel zu einer besseren Auftrennung und eindeutigeren Detektion führen.

Da der Immunoblot weniger sensitiv als die Immunfluoreszenz ist, könnte es sein dass das in der Immunfluoreszenz detektierte pp28 ebenfalls in den für den Immunoblot verwendeten Proben vorhanden war, aber unterhalb der Nachweisgrenze lag. Das virale Protein pp28 wird für die finale Membranhülle des HCMV-Virions benötigt und ist daher notwendig für die Bildung von neuen infektiösen Virionen [21, 43]. Das Protein pp28 ist darüber hinaus ebenfalls für die Freisetzung der Viruspartikel aus der Wirtszelle verantwortlich [19, 21]. Aufgrund dessen, dass pp28 nicht oder anscheinend in sehr geringen Mengen in den sowohl mit PI behandelten als auch unbehandelten Zellen nachweisbar ist, könnte begründen, warum die Erstellung der Wachstumskurve in Abschnitt 4.2 nicht funktionierte. Silva *et al.* 2005 [130] bewiesen experimentell, dass trotz Abwesenheit des Proteins pp28 HCMV über Zell-Zell-Kontakte in HFF-Zellen weitergegeben wurde. Auch dies könnte für die Caco-2-Zellen zutreffen (siehe Abschnitt 4.3).

Die dargestellte Diskussion der Ergebnisse verdeutlicht, dass zwar eine lytische Infektion von HCMV in den Caco-2-Zellen nachgewiesen werden konnte, aber wahrscheinlich nur sehr wenige Virionen in den extrazellulären Raum freigesetzt wurden.

Durch Einsatz eines zellassozierten Virus konnte nicht nur die Infektion der Caco-2-Zellen verbessert, sondern auch die Wirkung der PI in Bezug auf die Verbreitung von HCMV über Zell-Zell-Kontakte untersucht werden.

Bei der EC<sub>50</sub>-Bestimmung erwies sich Bortezomib im Vergleich zu MG132 als effektiverer PI, dennoch wurde ein Abbau der Wirkung nach 72 h bei der Untersuchung der Verbreitung von HCMV über Zell-Zell-Kontakte festgestellt.

Des Weiteren spielen neben den antiviralen Effekten der PI auch zytotoxische Effekte eine entscheidende Rolle, um die Plaquezahl in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu reduzieren.



## 6 Zusammenfassung

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ein ubiquitäres Pathogen. Wie alle Viren hat HCMV eine Vielzahl verschiedenster Strategien entwickelt, um zelluläre Prozesse zugunsten ihrer eigenen Vermehrung zu beeinflussen. In vorherigen Studien wurde bereits die Notwendigkeit des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) für die HCMV-Replikation in HELF bestätigt. Tumorzellen zeigen dabei eine besonders empfindliche Reaktion auf eine Proteasominhibition, da das UPS in Tumorzellen aufgrund ihrer erhöhten Zellproliferation und damit aufgrund ihres erhöhten Stoffwechsels übermäßig aktiv ist.

Die vorliegende Arbeit untersucht, welche grundlegende Rolle das UPS durch die Verwendung von Proteasominhibitoren (PI) (Bortezomib, MG132) für die HCMV-Infektion in Colonkarzinom-Zellen (eine Epithelzelllinie) spielt und ob sich diese Zellen grundsätzlich mit HCMV infizieren lassen.

Mittels Bestimmung der *effective concentration 50 %* ( $EC_{50}$ ) konnte eine antivirale Aktivität der PI ermittelt und dargelegt werden, dass das UPS essentiell für die HCMV-Infektion in Caco-2-Zellen ist. Bortezomib erwies sich als effektiverer PI als MG132. Allerdings zeigten die PI neben dem antiviralen auch einen starken zytotoxischen Effekt. Dies zeichnete sich durch relativ niedrigere Werte für den jeweiligen Selektionsindex (SI) im Vergleich zu anderen Zelllinien aus. Bei der Untersuchung des Einflusses der PI auf die Freisetzung infektiöser HCMV-Partikel durch Verwendung von PI behandelten Überständen konnten zu den jeweiligen Zeiten weder Plaques noch infizierte Einzelzellen detektiert werden.

Durch Verwendung eines zellassozierten Virus konnte bewiesen werden, dass die Ausbreitung von HCMV in diesen Epithelzellen über Zell-Zell-Kontakte erfolgt. Mit diesen Wachstumskurven konnte gezeigt werden, dass die PI eine inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Virionen haben. MG132 zeichnete sich durch eine höhere Stabilität in Zellkultur als Bortezomib aus, da nach 72 h p.i. die Wirksamkeit von Bortezomib abgebaut wurde.

In der Immunfluoreszenz bzw. im Immunoblot konnten in der Kontrolle *w/o* sowie als auch in den mit den PI behandelten, infizierten Zellen gezeigt werden, dass die PI keinen Effekt auf die virale Proteinexpression haben.

Mittels Immunfluoreszenz wurde weiterhin die starke Zytotoxizität der PI veranschaulicht. Dabei trägt anscheinend auch die HCMV-Infektion in den Caco-2-Zellen zur Hemmung der Zellproliferation sowie zur Reduktion der Zellzahl bei.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass (i) die HCMV-Infektion der Colonkarzinom-Zelllinie zu einer lytischen Infektion führt und (ii) die PI in Bezug auf die Verbreitung von HCMV über Zell-Zell-Kontakte eine antivirale Wirkung haben. Die ersten Ergebnisse können erste Aufschlüsse über die Wechselwirkung von HCMV und dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) in Karzinomzellen geben sowie richtungsweisend für eine zukünftige Erweiterung des Spektrums von Bortezomib als Therapeutikum von Tumoren sein.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> (A) Elektronenmikroskopische und (B) schematische Darstellung des humanpathogenen Cytomegalievirus .....	<b>8</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des DNA-Genoms des humanen Cytomegalievirus (HCMV) .....	<b>9</b>
<b>Abbildung 3:</b> Reifung der Virionen des humanen Cytomegalievirus (HCMV) .....	<b>12</b>
<b>Abbildung 4:</b> Aufbau des 26S-Proteasoms .....	<b>13</b>
<b>Abbildung 5:</b> 26S-Proteasom als Threonin-Protease .....	<b>14</b>
<b>Abbildung 6:</b> Generelle Struktur und Wirkungsweise verschiedener synthetischer reversibler PI .....	<b>15</b>
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung der verwendeten Proteasominhibitoren (a) Bortezomib, (b) MG132 .....	<b>22</b>
<b>Abbildung 8:</b> Einfluss von PI auf die HCMV-Infektion in Caco-2-Zellen .....	<b>33</b>
<b>Abbildung 9:</b> Wachstumskurve des Laborstammes AD169 in subkonfluent gewachsenen Caco-2-Zellen nach Inkubation mit den verwendeten PI (Bortezomib, MG132) mittels Yieldassay .....	<b>35</b>
<b>Abbildung 10:</b> Einfluss von PI auf die HCMV-Verbreitung über Zell-Zell-Kontakte in Caco-2-Zellen .....	<b>36</b>
<b>Abbildung 11:</b> Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz .....	<b>38</b>
<b>Abbildung 12:</b> Einfluss von HCMV und der PI auf die Reduktion der Zellzahl von Caco-2-Zellen.....	<b>39</b>
<b>Abbildung 13:</b> Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot .....	<b>41</b>
<b>Abbildung 14:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 11 zur Ermittlung der EC <sub>50</sub> von Bortezomib .....	<b>60</b>
<b>Abbildung 15:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 12 zur Ermittlung der EC <sub>50</sub> von Bortezomib .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 16:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 15 zur Ermittlung der EC <sub>50</sub> von MG132.....	<b>62</b>

**Abbildung 17:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 16 zur Ermittlung der  $EC_{50}$  von MG132..... 62

**Abbildung 18:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf IE1 in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz ..... 65

**Abbildung 19:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf UL44 in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz ..... 66

**Abbildung 20:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf pp28 in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz ..... 66

**Abbildung 21:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf IE1 in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot ..... 67

**Abbildung 22:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf UL44 in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot..... 67

**Abbildung 23:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf  $\alpha$ -Tubulin in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot..... 67

**Abbildung 24:** Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf pp28 in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot..... 67

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Geräte .....	<b>19</b>
<b>Tabelle 2:</b> Verbrauchsmaterialien .....	<b>19</b>
<b>Tabelle 3:</b> Chemikalien .....	<b>19</b>
<b>Tabelle 4:</b> Kommerzielle Kits .....	<b>20</b>
<b>Tabelle 5:</b> Monoklonale Antikörper .....	<b>21</b>
<b>Tabelle 6:</b> Sekundäre Antikörper .....	<b>21</b>
<b>Tabelle 7:</b> Puffer und Lösungen .....	<b>22</b>
<b>Tabelle 8:</b> Zellkulturmedien .....	<b>23</b>
<b>Tabelle 9:</b> Eingesetzte Konzentrationen der PI zur Bestimmung der $EC_{50}$ .....	<b>26</b>
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht der $CC_{50}$ , $EC_{50}$ und der SI der verwendeten PI.....	<b>33</b>
<b>Tabelle 11:</b> Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von Bortezomib im 1. Experiment .....	<b>60</b>
<b>Tabelle 12:</b> Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von Bortezomib im 2. Experiment .....	<b>60</b>
<b>Tabelle 13:</b> Ergebnisse aus dem 1. und 2. Experiment. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 8.....	<b>61</b>
<b>Tabelle 14:</b> $EC_{50}$ von Bortezomib in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen sowie dessen Standardabweichung .....	<b>61</b>
<b>Tabelle 15:</b> Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von MG132 im 1. Experiment.....	<b>61</b>
<b>Tabelle 16:</b> Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von MG132 im 2. Experiment.....	<b>62</b>
<b>Tabelle 17:</b> Ergebnisse aus dem 1. und 2. Experiment. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 8.....	<b>62</b>
<b>Tabelle 18:</b> $EC_{50}$ von MG132 in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen sowie dessen Standardabweichung .....	<b>63</b>

**Tabelle 19:** Wachstumskurve des Laborstammes AD169 in subkonfluent gewachsenen Caco-2-Zellen nach Inkubation mit den verwendeten PI (Bortezomib, MG132) mittels Yieldreduktionsassay. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 9 ..... **63**

**Tabelle 20:** Einfluss von PI auf die HCMV-Verbreitung über Zell-Zell-Kontakte in Caco-2-Zellen mittels Yieldreduktionsassay. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 10..... **64**

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] **Groß, U. (2006).** *Kurzlehrbuch – Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 415-420.
- [2] **Kayser, F.H., Böttger E.C., Zinkernagel, R.M., Haller, O., Eckert, J., Deplazes, P. (2005).** *Taschenlehrbuch – Medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 449-452.
- [3] **Kutza, A. S., Muhl, E., Hackstein, H., Kirchner, H., Bein, G. (1998).** High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 26(5): 1076-1082.
- [4] **Mutimer, D.J., Shaw, J., O'Donnell, K., Elias, E. (1997).** Enhanced (cytomegalovirus) viral replication after transplantation for fulminant hepatic failure. *Liver Transpl Surg* 3(5): 506-512.
- [5] **Prösch, S., Wendt, C. E.C., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D.H., Volk, H.-D., Döcke, W.-D. (2000).** A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 272(2): 357-365.
- [6] **Darai, G., Sonntag, H.-G., Zöller, L., Handermann, M., Tidona, C. A. (2009).** *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen: Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie, Prophylaxe.* Heidelberg: Springer Verlag, 210-214.
- [7] **Mattlinger, C. (2004).** *T- und B-Zellepitope von Glykoproteinen des Pseudorabiesvirus (Suid Herpesvirus 1).* Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen, Fakultät für Biologie, Tübingen, 3-4.
- [8] **Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H. (2007).** *Die Innere Medizin – Referenzwerk für den Facharzt.* Stuttgart: Schattauer GmbH, 1292-1293.
- [9] **Renz, H. (2003).** *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie.* Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 310-312.
- [10] **Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S., Ullmann, U. (2005).** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Heidelberg: Springer Verlag, 621.
- [11] **Dülligen, M., Kirov, A., Unverricht, H. (2013).** *Hygiene und medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart: Schattauer GmbH, 80-81.
- [12] **Doerr, H. W., Gerlich, W. H. (2002).** *Medizinische Virologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 238-383.
- [13] **Demmler, G. J. (1991).** Infectious diseases society of America and centers of disease control. Summary of a surveillance for congenital cytomegalovirus disease, *Rev Infect Dis* 13(2): 315-329.
- [14] **Meyer-Wittkopf, M., Buxmann, H., Gonser, M., Hamprecht, K. (2009).** Neues zur prä- und perinatalen Cytomegalovirus-Infektion. *FRAUENARZT* 50(6): 524-527.
- [15] **De Clercq, E. (2003).** New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. *J Antimicrob Chemother* 51(5): 1079-1083.
- [16] **De Clercq, E. (1993).** Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. *J Antimicrob Chemother* 32 Suppl A:121-132.
- [17] **Heizmann, W. R., Döller, P. C., Kropp, S., Bleich, S. (1999).** *Kurzlehrbuch – Medizinische Mikrobiologie und Immunologie.* Stuttgart: Schattauer GmbH, 187.
- [18] **Reddehase, M. J., Lemmermann, N. (2013).** *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention.* Norfolk (UK): Caister Academic Press, 86.
- [19] **Tomtishen III, J.P. (2012).** Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology* 9: 22.
- [20] **Crough, T., Khanna, R. (2009).** Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev* 22(1): 76-98.
- [21] **Kalejta, R. F. (2008).** Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(2): 249-265.

- [22] **Britt, W. J., Auger, D. (1985).** Identification of a 65 000 dalton virion envelope protein of human cytomegalovirus. *Virus Res* 4(1): 31-36.
- [23] **Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P., Britt, W. (2000).** Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* 74(24): 11881-11892.
- [24] **Huber, M. T., Compton, T. (1998).** The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol* 72(10): 8191-8197.
- [25] **Li, L., Nelson, J. A., Britt, W. J. (1997).** Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol* 71(4): 3090-3097.
- [26] **Bogner, E. (2002).** Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol* 12(2): 115-127.
- [27] **Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Chee, M.S., Hutchison, C.A. 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., and Preddie, E., et al. (1991).** The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome, *DNA Seq* 2(1): 1-12.
- [28] **Yu, D., Silva, M.C., Shenk, T. (2014).** Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Pnas* 100(21): 12396–12401.
- [29] **Roizman, B. (1979).** The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell* 16(3): 481-494.
- [30] **Stinski, M.F., Thomson, D.R., and Wathen, M.N. (1981).** Structure and Function of the cytomegalovirus genome. In: Nahmias, A., Dowle, W., Schinazi, R. (eds.): *The Human Herpesviruses: An interdisciplinary perspective*. Amsterdam: Elsevier, 137-152.
- [31] **Gibson W., Bogner E. (2013).** Morphogenesis of the cytomegalovirus virion and subviral particles. In: Reddehase M.J. (ed.): *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*. Norfolk (UK): Caister Academic Press, 230-246.
- [32] **Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A. (1997).** Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *JCB* 136(5): 1007-1021.
- [33] **Mocarski E. S., Shenk T., Pass R. F. (2007).** Cytomegaloviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds.): *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2701-2772.
- [34] **Meier, L. J., Stinski, M. F. (1996).** Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* 39(5-6): 331-342.
- [35] **Colberg-Poley, A. M. (1996).** Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus UL36-38, UL115-119, TRS1/IRS1 and US3 loci. *Intervirology* 39(5-6): 350-360.
- [36] **Stenberg, R.M. (1996).** The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* 39(5-6): 333-349.
- [37] **Geballe, A.P., Leach, F.S., and Mocarski, E.S. (1986).** Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *J Virol* 57(3): 864-874.
- [38] **Spaete, R.R., Mocarski, E.S. (1985).** Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts. *J Virol* 56(1): 135-143.
- [39] **Mocarski, E.S., Courcelle, C.T. (2001).** Cytomegaloviruses and their replication. In: Knipe, D., Howley, P., Griffin, D., Lamb, R., Martin, M., Straus, S. (eds.): *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2629-2673.
- [40] **Spector, D.H. (1996).** Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39(5-6): 361-377.



- [41] **Huang E. S., Chen S. T., Pagano J. S. (1973).** Human Cytomegalovirus. Purification and Characterisation of viral DNA. *J Virol* 12: 1473-1481.
- [42] **Stinski, M.F., Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., Goldstein, L.C. (1983).** Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol* 46(1): 1-14.
- [43] **Britt W. (2007).** CMV maturation and egress. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (eds.): *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press, 311–323.
- [44] **Roizman, B. (1993).** The family herpesviridae: a brief introduction. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopez, C. (eds.): *The human herpesviruses*, New York: Raven Press, 1-9.
- [45] **Tandon, R., Mocarski, E.S. (2012).** Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol* 20(8): 392-401.
- [46] **Bogner, E., Radsak, K., Stinski, M.F. (1998).** The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity, *J Virol* 72(3): 2259-2264.
- [47] **Scheffczik, H., Savva, C.G., Holzenburg, A., Kolesnikova, L., Bogner, E. (2002).** The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res* 30(7): 1695-1703.
- [48] **Hwang, J.-S., Bogner, E. (2002).** ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J Biol Chem* 277(9): 6943-6948.
- [49] **Scholz, B., Rechter, S., Drach, J.C., Townsend, L.B., Bogner, E. (2003).** Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res* 31(5): 1426-1433.
- [50] **Rixon, F.J. (1993).** Structure and assembly of herpesviruses. *Semin Virol* 4(3): 135-144.
- [51] **Perdue, M.L., Cohen, J.C., Randall, C.C., O'Callaghan, D.J. (1976).** Biochemical studies of the maturation of herpes virus nucleocapsid species. *Virology* 74(1): 194-208.
- [52] **Gibson, W. (1983).** Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses. *Virology* 128(2): 391-406.
- [53] **Welch, A.R., Woods, A.S., McNally, L.M., Cotter, R.J., Gibson, W. (1991).** A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: Identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10792-10796.
- [54] **Gibson, W. (1996).** Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39(5-6): 389-400.
- [55] **Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., Granzow, H. (2006).** Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9(4): 423-429.
- [56] **Cepeda, V., Esteban, M., Fraile-Ramos, A. (2010).** Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol* 12: 386–404.
- [57] **Mettenleiter, T.C. (2002).** Herpesvirus assembly and egress, *J Virol* 76(4): 1537-1547.
- [58] **Irmiere, A., Gibson, W. (1983).** Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130(1): 118-133.
- [59] **Demartino, G. N., Gillette, T. G. (2007).** Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* 129(4):659-662.
- [60] **Varshavsky, A. (1997).** The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 22(10): 383-387.
- [61] **Hilt, W. (2005).** Das Ubiquitin-Proteasom-System in Proteinqualitätskontrolle und Regulation. *BIOspektrum* 11:446-449.
- [62] **Glickman, M. H., Ciechanover, A. (2002).** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82(2): 373-428.

- [63] Weiler, E. W., Nover, L. (2008): *Allgemeine und molekulare Botanik von 2008*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 570-572.
- [64] Sheaff, R.J., Singer, J.D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J.M., Clurman, B.E. (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 5(2): 403-410.
- [65] Tanaka, K., Tsurumi, C. (1997). The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol Biol Rep* 24(1-2): 3-11.
- [66] Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2012). *Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 373–375.
- [67] Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: 801-847.
- [68] Munk, K. (2010). *Taschenlehrbuch Biologie: Genetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 225.
- [69] Myung, J., Kim, K.B., Crews, C.M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21(4): 245-273.
- [70] Bogyo, M., Wang, E.W. (2002). Proteasome Inhibitors: Complex Tools for a Complex Enzyme. *Curr Top Microbiol Immunol* 268:185-208.
- [71] Genin, E., Reboud-Ravaux, M., Vidal, J. (2010). Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* 10(3): 232-256.
- [72] Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268(5211): 726-731.
- [73] Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H.B., Eloffson, M., Sin, N., Crews, C.M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10403-10408.
- [74] Malva, J., Rego, A. C., Cunha, R., Oliveira, C. (2007). *Interaction Between Neurons and Glia in Aging and Disease*. New York: Springer Verlag, 492-494.
- [75] Groll, M., Berkers, C.R., Ploegh, H.L., Ovaa, H. (2006). Crystal Structure of the Boronic Acid-Based Proteasome Inhibitor Bortezomib in Complex with the Yeast 20S Proteasome, *Structure* 14(3): 451–456.
- [76] Kisselev, A.F., Goldberg, A.L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8(8): 739-758.
- [77] Galderisi, U., Jori, F. P., Giordano, A. (2003). Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22(33): 5208–5219.
- [78] Almond, J. B., Cohen, G. M. (2002). The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 16(4): 433-443.
- [79] Johnson, D. E. (2013). *Cell Death Signaling in Cancer Biology and Treatment*. New York: Springer Science + Business Media B.V., 312.
- [80] Meloni, D. (2007). *Clinical Radiation Oncology*. Philadelphia: Elsevier Inc., 104.
- [81] Quirling, M. (2004). *TNF-vermittelte Signalübertragung – Rollen von IKK-Subkomplexen und Charakterisierung der TNF-Toleranz*. Göttingen: Cuvillier Verlag, 1.
- [82] Crawford, L. J., Walker, B., Irvine, A. E. (2011). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal* 5(2): 101-110.
- [83] Myelom Hilfe München (MHM) (2004). Velcade® – Wirkstoff Bortezomib <http://www.myelom-lymphom.at/krankheitsformen/myelom/diagnose-und-therapie/bortezomib-velcade-information/> , zuletzt aufgerufen am 06.08.2014.
- [84] Marre, R., Mertens, Th., Trautmann, M., Zimmerli, W. (2008). *Klinische Infektiologie: Infektionskrankheiten erkennen und behandeln*. München: Elsevier GmbH, 4.

- [85] Graña, X., Garriga, J., Mayol, X. (1998): Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17(25): 3365-3383.
- [86] Kalejta, R. F., Bechtel, J. T., Shenk T. (2003). Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 23(6): 1885-1895.
- [87] Saffert, R. T., Kalejta, R. F. (2006). Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol* 80(8): 3863–3871.
- [88] Cantrell, S. R., Bresnahan, W. A. (2005). Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication. *J Virol* 79(12): 7792-7802.
- [89] Hwang, J., Kalejta, R. F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* 367(2): 334-338.
- [90] Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2010). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Springer-Spektrum-Verlag, 589-593.
- [91] Tortorella, D., Gewurz, B., Schust, D., Furman, M., Ploegh, H. (2000). Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. *Immunol Invest* 29(2): 97-100.
- [92] Kaspari, M., Tavalai, N., Stamminger, T., Zimmermann, A., Schilf, R., Bogner, E. (2008). Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. *FEBS Lett* 582(5): 666-672.
- [93] Prösch, S., Priemer, C., Höflich, C., Liebentha, C., Babel, N., Krüger, D.H., Volk, H.-D. (2003). Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. *Antivir Ther* 8(6): 555-567.
- [94] Sadanari, H., Tanaka, J., Li, Z., Yamada, R., Matsubara, K., Murayama, T. (2009). Proteasome inhibitor differentially regulates expression of the major immediate early genes of human cytomegalovirus in human central nervous system-derived cell lines. *Virus Res* 142(1-2): 68-77.
- [95] **Pharmazeutische Zeitung (PZ)** (2004): Bortezomib, (Velcade® Injektion, Janssen-Cilag) <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=122> , zuletzt aufgerufen am 06.08.2014.
- [96] European Collection of Cell Cultures (ECACC): General Cell Collection: CACO-2, [http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=cacc\\_gc](http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/cellines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=cacc_gc) , zuletzt aufgerufen am 25.08.2014.
- [97] Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., Huebner, R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 92(2): 418-424.
- [98] **Selleck Chemicals**: Bortezomib (PS-341) <http://file.selleckchem.com/downloads/struct/Bortezomib-Velcade-chemical-structure-S1013.gif> , zuletzt aufgerufen am 06.08.2014.
- [99] **Selleck Chemicals**: MG-132 <http://file.selleckchem.com/downloads/struct/MG-132-chemical-structure-s2619.gif> , zuletzt aufgerufen am 06.08.2014.
- [100] Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M. (2003): *Principles of Virology*. Washington, DC: ASM Press.
- [101] O'Reilly, D., Miller, L., Luckow, V. (1994): *Baculovirus Expressing Vectors: A laboratory manual*. Oxford: Oxford University Press.

- [102] Universität Heidelberg: Molekulare Mechanismen der Pathogenese bei Infektionskrankheiten  
[http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst\\_hygiene/molekulare\\_virologie/PDF/WS06\\_07/ws06-07\\_03\\_virusdiagnostik\\_und\\_verlaufsformen.pdf](http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst_hygiene/molekulare_virologie/PDF/WS06_07/ws06-07_03_virusdiagnostik_und_verlaufsformen.pdf) , zuletzt aufgerufen am 25.08.2014.
- [103] **Dulbecco, R., Vogt, M. (1953)**. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18, 273-279.
- [104] **Kieflich, A. (2004)**: *Struktur- und Funktionsbeziehungen im Zellkern: PML-Kernkörperchen und Transkription*. Göttingen: Cuvillier Verlag, 37-38.
- [105] Engelke, D.R., Rossi, J.J. (2005): *Methods in Enzymology – RNA Interference*. San Diego (USA): Elsevier Academic Press, 136.
- [106] **Javois, L.C. (1999)**: Immunocytochemical: Methods and Protocols, New Jersey: Humana Press Inc., 344.
- [107] **Luttmann, W., Bratke, Kai, Küpper, M., Myrtek, D. (2014)**: Der Experimentator: Immunologie, Heidelberg: Springer Spektrum, 84-85.
- [108] **Hallbach, J. (2001)**: Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 32-33.
- [109] **Mohrlüder, J. (2007)**: Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen, Jülich: Forschungszentrum Jülich GmbH, 36-37.
- [110] **Universität Leipzig**: [http://www.uni-leipzig.de/~belder/Praktikum/Versuch\\_Gelelektrophorese.pdf](http://www.uni-leipzig.de/~belder/Praktikum/Versuch_Gelelektrophorese.pdf) , zuletzt aufgerufen am 25.08.2014.
- [111] **Michov, B. (1995)**: Elektrophorese: Theorie und Praxis, Berlin: de Gruyter, 271-275.
- [112] **Holtzauer, M. (2006)**: Basic Methods for the Biochemical Lab, Heidelberg: Springer Verlag, 68-70.
- [113] **Plattner, H., Hentschel, J. (2011)**: Zellbiologie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 294-295.
- [114] **Newman, W.G. (2010)**. Pharmacogenetics: Making Cancer Treatment Safer and More Effective. New York: Springer Science + Business Media B.V., 20.
- [115] **Watson, R.R. (2012)**: *DHEA in Human Health and Aging*, Boca Raton (USA): CRC Press, 308.
- [116] **Katragadda, S. (2001)**: Design of Amino Acid Prodrugs of Acyclovir for Improved Bioavailability and Therapeutic Activity: Utility in Treating Ocular, Oral and Genital Herpes Infections. Dissertation at Andhra University (India), 101.
- [117] **Noriega, V.M., Gardner, T.J., Redmann, V., Bongers G., Lira S.A., Tortorella D. (2014)**. Human cytomegalovirus US28 facilitates cell-to-cell viral dissemination. *Viruses* 6(3): 1202-1218.
- [118] **Banks, L., Pim, D., Thomas, M. (2003)**. Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. *Trends Biochem Sci* 28(8):452-459.
- [119] **Gao, G., Luo, H. (2006)**. The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can J Physiol Pharmacol* 84(1):5-14.
- [120] **Shackelford, J., Pagano, J. S. (2005)**. Targeting of host-cell ubiquitin pathways by viruses. *Essays Biochem* 41: 139-156.
- [121] **Esclatine, A., Lemullois, M., Servin, A. L., Quero, A., Geniteau-Legendre, M. (2000)**. Human cytomegalovirus infects Caco-2 intestinal epithelial cells basolaterally regardless of the differentiation state. *J Virol* 74(1): 513-517.
- [122] **Radsak, K., Fuhrmann, R., Franke, R.P., Schneider, D., Kollert, A., Brücher, K.H., Drenckhahn, D. (1989)**. Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells. *Arch Virol* 107(1-2): 151-158.

- [123] **Elek, S. D., Stern, H. (1974).** Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* 1(7845):1-5.
- [124] **Prichard, M.N., Penfold, M.E., Duke, G.M., Spaete, R.R., Kemble, G.W. (2001).** A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev Med Virol* 11(3): 191-200.
- [125] **European Medicines Agency (2014).** Velcade Bortezomib  
[http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000539/WC500048136.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000539/WC500048136.pdf) , zuletzt aufgerufen am 06.08.2014.
- [126] **Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Thompson, E. A., Albrecht, T. (1996).** Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G<sub>1</sub>. *Virology* 224(1):150–160.
- [127] **Dittmer, D., Mocarski, E. S. (1997).** Human cytomegalovirus infection inhibits G<sub>1</sub>/S transition. *J Virol* 71(2):1629–1634.
- [128] **Lu, M., Shenk, T. (1996).** Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G<sub>1</sub> to S. *J Virol* 70(12): 8850–8857.
- [129] **Karl Fent (2013).** *Ökotoxikologie: Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 238-239.
- [130] **Silva, M. C., Schröer, J., Shenk, T. (2005).** Human cytomegalovirus cell-to-cell spread in the absence of an essential assembly protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6): 2081-2086.

## 10 Anhang

### 10.1 Bestimmung der $EC_{50}$ (Abschnitt 4.1)

#### 10.1.1 $EC_{50}$ von Bortezomib in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen (MOI=10)

Experiment 1:

Konzentration des Inhibitors [nM]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1
1	120	96	64	46	28	0	0	0	0
2	116	60	64	43	16	0	0	0	0
3	116	92	76	51	8	0	0	0	0
MW	117	83	68	47	17	0	0	0	0
%	100	70,5	58,0	39,8	14,8	0,0	0,0	0,0	0,0
STABW	2,3	19,7	6,9	4,0	10,1	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 11: Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von Bortezomib im 1. Experiment.

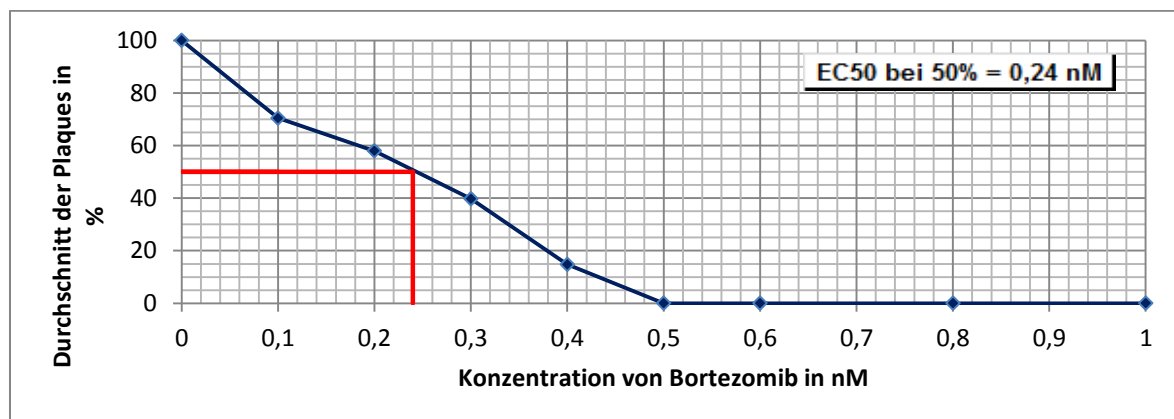
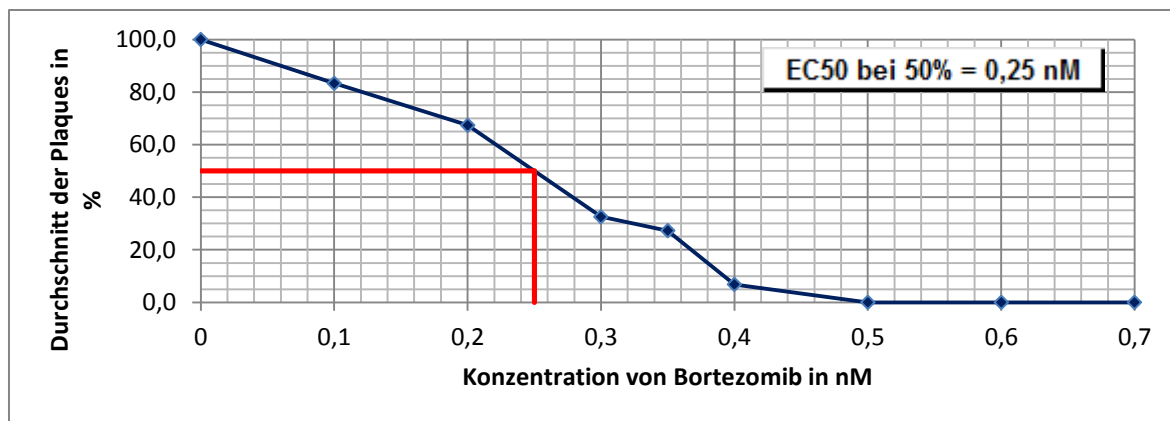


Abb. 14: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 11 zur Ermittlung der  $EC_{50}$  von Bortezomib.

Experiment 2:

Konzentration des Inhibitors [nM]	0	0,1	0,2	0,3	0,35	0,4	0,5	0,6	0,7
1	168	156	112	68	48	16	0	0	0
2	172	136	132	48	52	12	0	0	0
3	188	148	112	56	44	8	0	0	0
MW	176	147	119	57	48	12	0	0	0
%	100	83,3	67,4	32,6	27,3	6,8	0,0	0,0	0,0
STABW	10,6	10,1	11,5	10,1	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 12: Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von Bortezomib im 2. Experiment.

Abb. 15: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 12 zur Ermittlung der EC<sub>50</sub> von Bortezomib.Ergebnisse aus Experiment 1 und 2:

Konzentration von BZ [nM]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
MW 1	117	83	68	47	17	0	0	0
%	100	70,94	58,12	40,17	14,53	0,00	0,00	0,00
MW 2	176	147	119	57	12	0	0	0
%	100	83,52	67,61	32,39	6,82	0,00	0,00	0,00
MW der %	100,00	77,23	62,87	36,28	10,67	0,00	0,00	0,00
STABW	0	8,90	6,71	5,50	5,45	0,00	0,00	0,00

Tabelle 13: Ergebnisse aus dem 1. und 2. Experiment. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 8.

Bortezomib	
EC <sub>50</sub> aus Exp. 1	0,24 nM
EC <sub>50</sub> aus Exp. 2	0,25 nM
MW	0,25 nM
STABW	0,01 nM

Die ermittelte EC<sub>50</sub> von Bortezomib = 0,25 nM ± 0,01 nM.Tabelle 14: EC<sub>50</sub> von Bortezomib in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen sowie dessen Standardabweichung.**10.1.2 EC<sub>50</sub> von MG132 in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen (MOI=10)***Experiment 1:*

Konzentration des Inhibitors [nM]	0	1	5	10	20	30	40	50
1	88	92	68	60	52	24	4	0
2	84	80	68	64	48	8	4	0
3	104	100	56	48	40	28	2	0
MW	92	91	64	57	47	20	3	0
%	100,0	98,6	69,6	62,3	50,7	21,7	3,6	0,0
STABW	10,6	10,1	6,9	8,3	6,1	10,6	1,2	0,0

Tabelle 15: Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von MG132 im 1. Experiment.

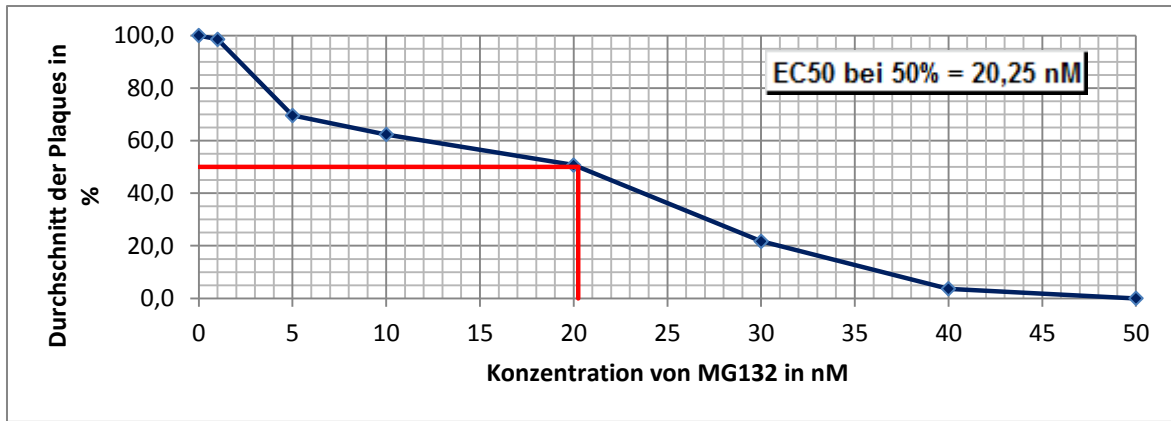


Abb. 16: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 15 zur Ermittlung der  $EC_{50}$  von MG132.

*Experiment 2:*

Konzentration des Inhibitors [nM]	0	1	5	10	20	30	40	50
1	256	200	172	112	92	24	4	0
2	248	192	180	160	140	12	0	0
3	220	152	184	140	128	16	8	0
MW	241	181	179	137	120	17	4	0
%	100	75,1	74,0	56,9	49,7	7,2	1,7	0,0
STABW	18,9	25,7	6,1	24,1	25,0	6,1	4,0	0,0

Tabelle 16: Anzahl der Plaques in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen zu den jeweiligen Konzentrationen von MG132 im 2. Experiment.

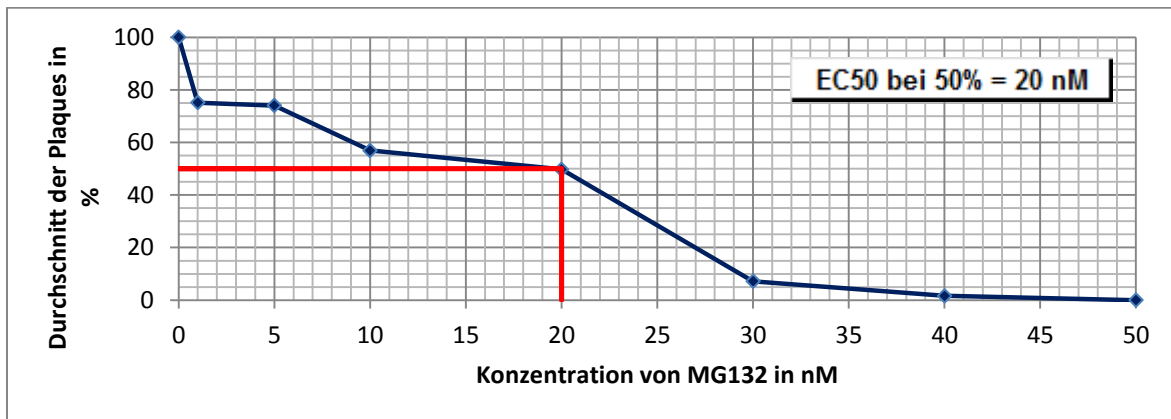


Abb. 17: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 16 zur Ermittlung der  $EC_{50}$  von MG132.

Ergebnisse aus Experiment 1 und 2:

Konzentration von MG132 [nM]	0	1	5	10	20	30	40	50
MW 1	92	91	64	57	47	20	3	0
%	100	98,91	69,57	61,96	51,09	21,74	3,26	0,00
MW 2	241	181	179	137	120	17	4	0
%	100	75,10	74,27	56,85	49,79	7,05	1,66	0,00
MW der %	100	87,01	71,92	59,40	50,44	14,40	2,46	0,00
STABW	0,00	16,84	3,33	3,61	0,92	10,38	1,13	0,00

Tabelle 17: Ergebnisse aus dem 1. und 2. Experiment. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 8.



MG132	
EC <sub>50</sub> aus Exp. 1	20,25 nM
EC <sub>50</sub> aus Exp. 2	20,00 nM
MW	20,13 nM
STABW	0,18 nM

Die ermittelte EC<sub>50</sub> von Bortezomib = 0,25 nM ± 0,01 nM.

Tabelle 18: EC<sub>50</sub> von MG132 in HCMV-infizierten Caco-2-Zellen sowie dessen Standardabweichung.

## 10.2 Yieldreduktionsassay

### 10.2.1 Yieldreduktionsassay mit Überstand (Abschnitt 4.2)

		0	24	48	72	96	120	144	168	192
mock	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	STABW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Potenz	1	1	1	1	1	1	1	1	1
w/o	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	MW	0	0	0	0	1	0,3	0	0	0
	STABW	0	0	0	0	1	0,58	0	0	0
	Potenz	1	1	1	1	2	1,33	1	1	1
Bortezomib	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	STABW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Potenz	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MG132	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	STABW	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Potenz	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 19: Wachstumskurve des Laborstammes AD169 in subkonfluent gewachsenen Caco-2-Zellen nach Inkubation mit den verwendeten PI (Bortezomib, MG132) mittels Yieldreduktionsassay. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 9.

### 10.2.2 Yildreduktionsassay mit zellassoziertem Virus (Abschnitt 4.3)

		0	24	48	72	96	120	144	168	192
<b>mock</b>	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>MW</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>STABW</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Potenz</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>w/o</b>	<b>1</b>	0	71	32	15	9	16	18	30	18
	<b>2</b>	0	79	33	16	14	14	16	21	15
	<b>3</b>	0	72	33	12	14	11	13	25	16
	<b>MW</b>	0	74	33	14	12	14	16	25	16
	<b>STABW</b>	0,00	4,36	0,58	2,08	2,89	2,52	2,52	4,51	1,53
	<b>Potenz</b>	1	74	33	14	12	14	16	25	16
<b>Bortezomib</b>	<b>1</b>	0	29	17	7	14	17	13	28	26
	<b>2</b>	0	49	19	5	11	16	16	27	20
	<b>3</b>	0	24	21	4	10	14	18	35	29
	<b>MW</b>	0	34	19	5	12	16	16	30	25
	<b>STABW</b>	0,00	13,23	2,00	1,53	2,08	1,53	2,52	4,36	4,58
	<b>Potenz</b>	1	34	19	5	12	16	16	30	25
<b>MG132</b>	<b>1</b>	0	28	8	4	5	4	4	5	5
	<b>2</b>	0	35	20	5	2	3	6	4	3
	<b>3</b>	0	29	9	3	2	5	4	6	4
	<b>MW</b>	0	31	12	4	3	4	5	5	4
	<b>STABW</b>	0,00	3,79	6,66	1,00	1,73	1,00	1,15	1,00	1,00
	<b>Potenz</b>	1	31	12	4	3	4	5	5	4

Tabelle 20: Einfluss von PI auf die HCMV-Verbreitung über Zell-Zell-Kontakte in Caco 2-Zellen mittels Yildreduktionsassay. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 10.

### 10.3 Fotos der Immunfluoreszenz (Vergrößerung: 40x)

*Subkonfluente Caco-2-Zellen mit AD169 (MOI = 10) infiziert.  
Immunfluoreszenzanalyse 7 d p.i.*

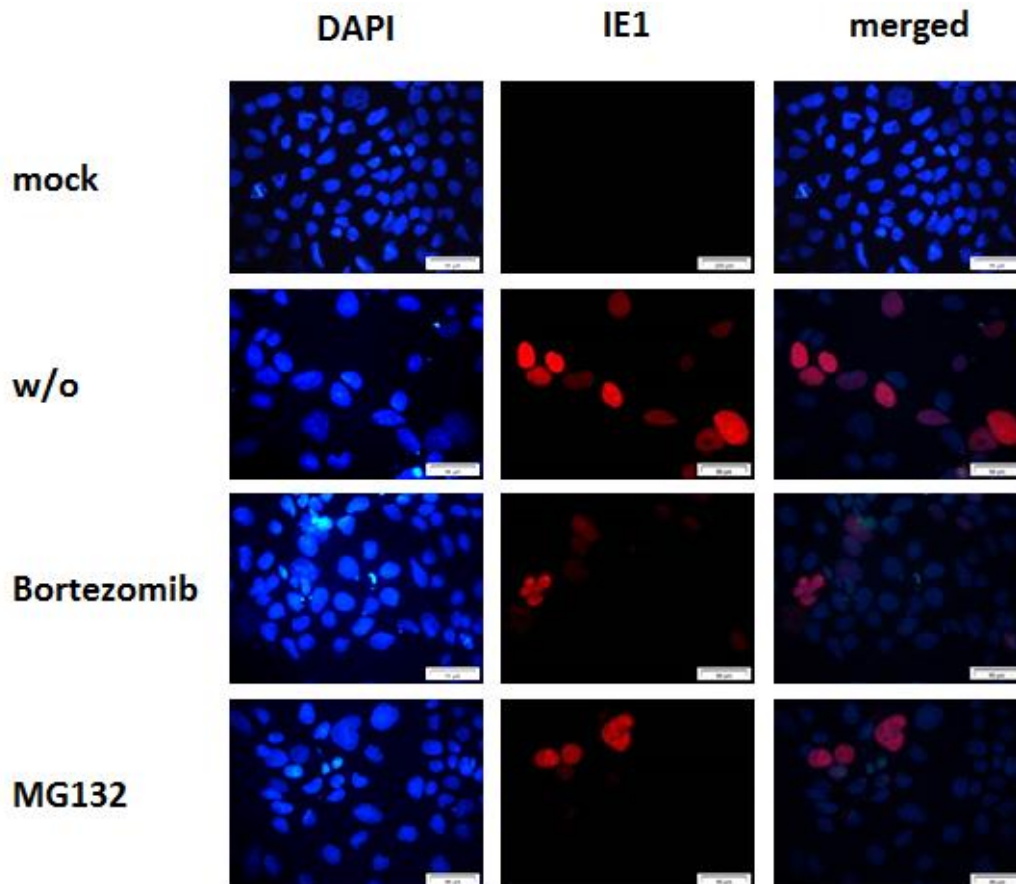


Abbildung 18: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf IE1 in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz.

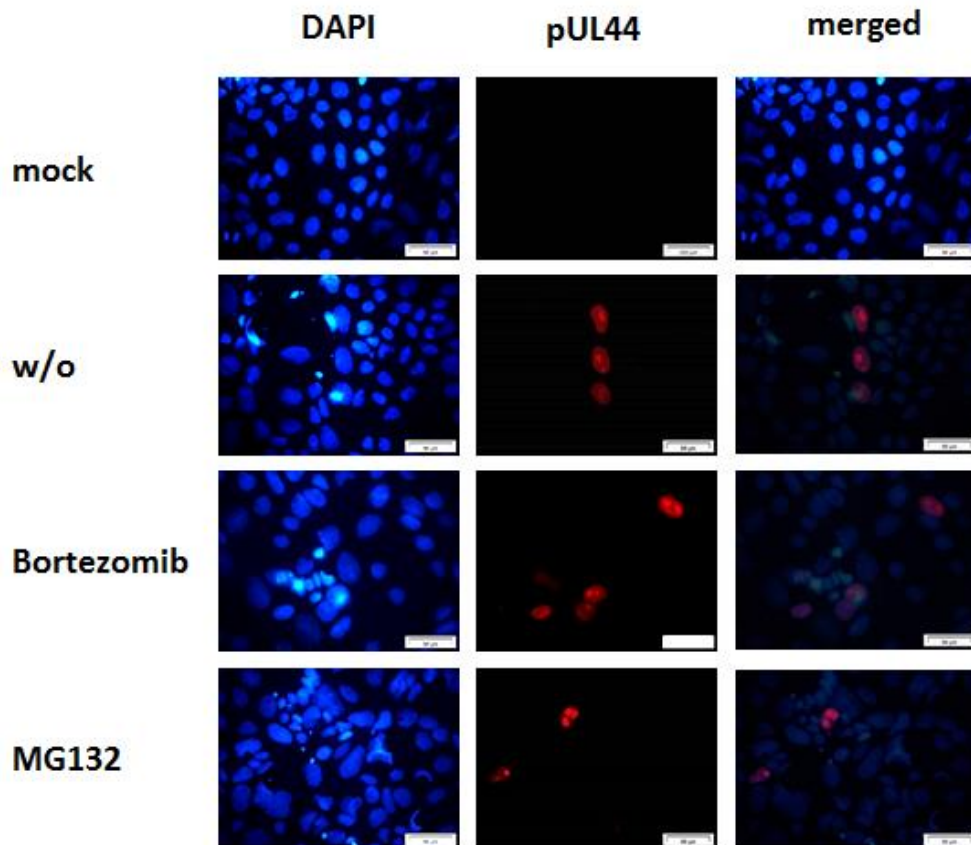


Abbildung 19: Abbildung 28: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf UL44 in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz.

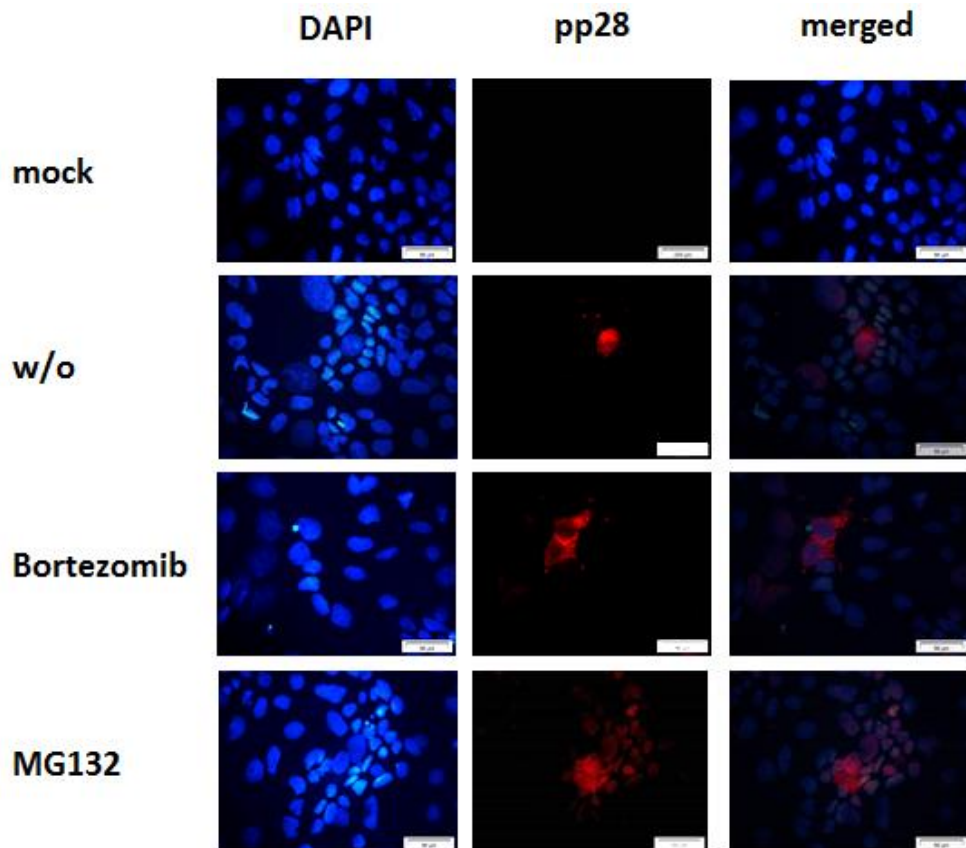


Abbildung 20: Abbildung 38: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf pp28 in infizierten Caco-2-Zellen in der Immunfluoreszenz.

## 10.4 Membranen des Immunoblots

Subkonfluente Caco-2-Zellen mit AD169 (MOI = 10) infiziert. Immunoblot 7 d p.i.

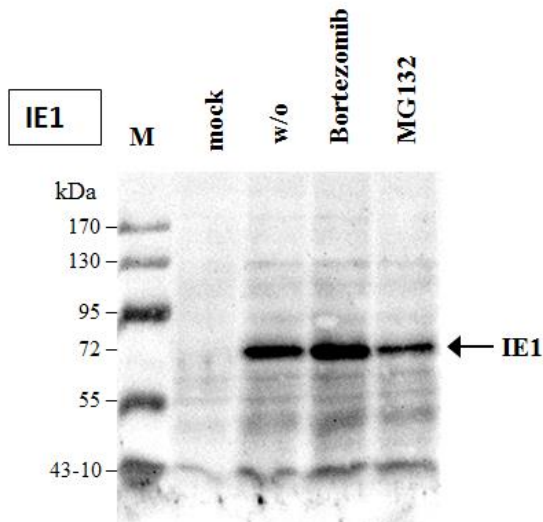


Abbildung 21: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf IE1 in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot.

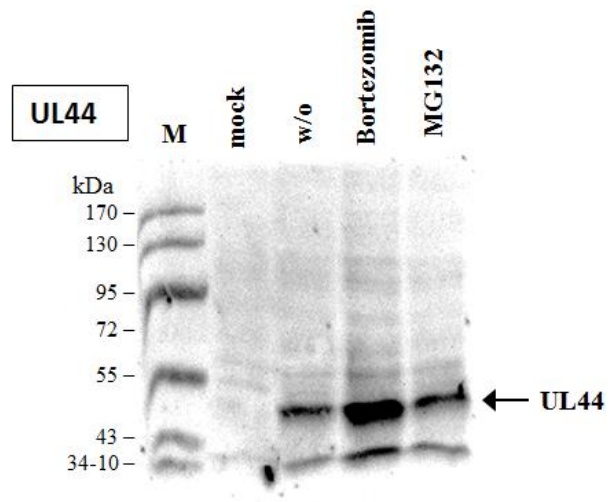


Abbildung 22: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf UL44 in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot.

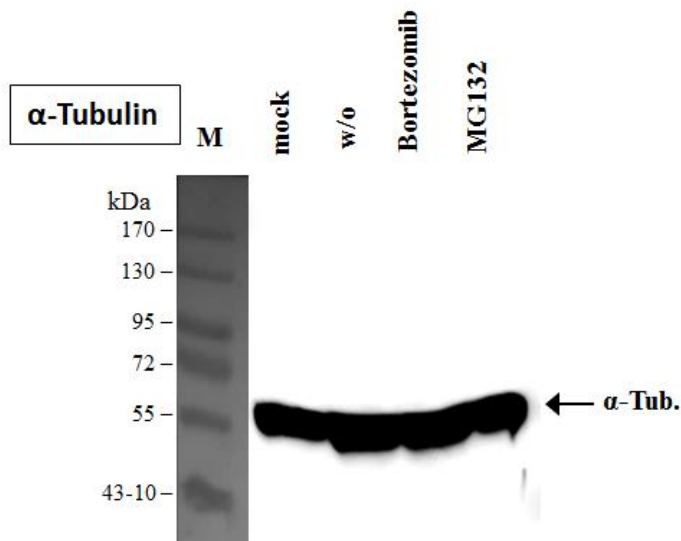


Abbildung 23: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf  $\alpha$ -Tubulin in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot.

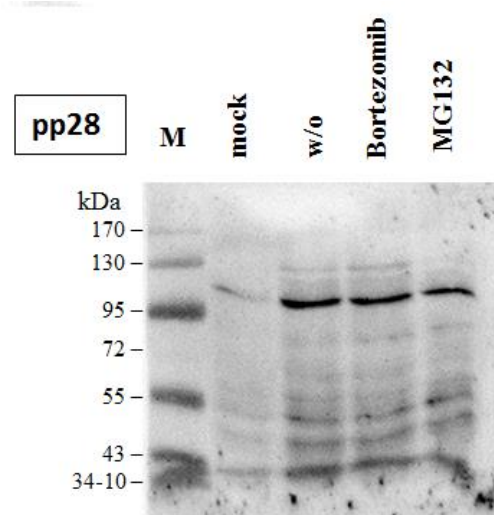


Abbildung 24: Einfluss von Bortezomib bzw. MG132 auf die HCMV-Proteinexpression in Bezug auf pp28 in infizierten Caco-2-Zellen im Immunoblot.