

Aus dem Institut für Virologie Campus Charité Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Wirkung von Humanem Cytomegalievirus
und Bortezomib auf die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Heike Härtel

aus Bad Saarow-Pieskow

Datum der Promotion: 23.06.2019

*In Gedenken an meinen Papa
In Liebe und größter Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Abstract	1
2 Einleitung	4
2.1 Das kolorektale Karzinom	4
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Definition und Ätiologie	4
2.1.3 Molekulare Mechanismen der Pathogenese	5
2.1.4 Symptome und Diagnostik	7
2.1.5 Klassifikation, Therapie und Prävention	8
2.2 Einfluss der Fibroblasten im Tumormikrogewebe des kolorektalen Karzinoms	9
2.3 Das Humane Cytomegalievirus	10
2.3.1 Taxonomie	10
2.3.2 Medizinische Aspekte	11
2.3.3 Morphologie	13
2.3.4 Infektionszyklus, virale Genexpression und Morphogenese	14
2.4 Nachweis und Einfluss des Humanen Cytomegalievirus im kolorektalen Karzinom	15
2.5 Klassifikation und Wirkungsweise der Proteasominhibitoren	18
3 Fragestellung	22
4 Material	23
4.1 Zelllinien	23
4.1.1 Humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	23
4.1.2 <i>Human embryonic lung fibroblasts</i>	23
4.1.3 <i>Human foreskin fibroblasts</i>	23
4.2 Virusstamm	24
4.3 Chemikalien	24
4.4 Kits	26
4.5 Antikörper	26
4.5.1 Monoklonale, primäre Antikörper	26
4.5.2 Sekundäre Antikörper	27
4.6 Proteasominhibitoren	27
4.7 Medien	28
4.7.1 Flüssigmedium für die Zellkultivierung	28
4.7.2 Halbfestes Methylcellulose-Kulturmedium (Methocel)	28
4.8 Allgemeine Puffer und Lösungen	28
4.9 Verbrauchsmaterialien	29
4.10 Geräte	30
4.11 Software	30

5	Methoden	32
5.1	Zellbiologische Methoden	32
5.1.1	Kultivierung und Subkultivierung der Zelllinien Caco-2, HELF Fi301 und HFF	32
5.1.2	Kryokonservierung und Revitalisierung der Zelllinien	32
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	32
5.1.4	Herstellung von Virusstocks und Virustitration	34
5.1.5	Experimentelle Virusinfektion	35
5.1.6	Plaquereduktionsassay	36
5.1.7	Zytotoxizitätsbestimmung (XTT-Assay)	38
5.1.8	JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	38
5.1.9	Ko-Kultur und Ko-Infektion	39
5.2	Molekularbiologische Methode	40
5.2.1	Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA)	40
5.3	Proteinchemische Methode	41
5.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
5.4	Immunchemische Methoden	42
5.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz	42
5.4.2	Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	44
5.4.3	Western-Blot	45
5.4.3.1	Proteintransfer	45
5.4.3.2	Immundetektion	46
5.5	Durchflusszytometrie	47
5.5.1	Detektion viraler Proteine	47
5.5.2	Analyse der Apoptose	48
5.6	Statistische Auswertung	50
6	Ergebnisse	51
6.1	Nachweis der Permissivität der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat	51
6.2	Einfluss von Bortezomib auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	53
6.3	Zeitabhängiger Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 unter Einfluss des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats und/oder Bortezomib	54
6.3.1	Einfluss von HCMV und/oder Bortezomib bei längerer Gegenwart auf die Apoptose/Nekrose bei den Caco-2	54
6.3.1.1	Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten mittels Durchflusszytometrie	54
6.3.1.2	Vergleich von Apoptose-Effekten mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	57
6.3.1.3	Vergleich von Apoptose-Effekten mittels Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	58
6.3.2	Einfluss von HCMV und/oder Bortezomib bei kürzerer Gegenwart auf die Apoptose/Nekrose bei den Caco-2	59
6.3.2.1	Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten mittels Durchflusszytometrie	60

6.3.2.2	Vergleich von Apoptose-Effekten mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	65
6.3.2.3	Vergleich von Apoptose-Effekten mittels Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	66
6.3.2.4	Vergleich von Nekrose-Effekten mittels PicoGreen [®] -Assay	68
6.4	Effekte der Ko-Kultur der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit primären Fibroblasten	69
6.4.1	Nachweis der Ko-Kultur von Caco-2 mit primären Fibroblasten	69
6.4.2	Einfluss der Ko-Kultur und Ko-Infektion auf die HCMV-Infektion der Caco-2	69
6.4.3	Einfluss von HCMV und/oder Bortezomib bei längerer Gegenwart auf die Apoptose/Nekrose bei der Ko-Kultur	72
6.4.3.1	Nachweis der Permissivität der Ko-Kultur für HCMV und Vergleich von Apoptose-Effekten mittels Western-Blot	73
6.4.3.2	Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten mittels Durchflusszytometrie	74
7	Diskussion	80
7.1	Diskussion der Methoden	80
7.1.1	Etablierte Methoden	80
7.1.1.1	Trypanblau-Ausschlusstest	80
7.1.1.2	Plaquereduktionsassay	81
7.1.1.3	Indirekte Immunfluoreszenz	81
7.1.1.4	PicoGreen [®] -Assay	82
7.1.1.5	Kommerzielle Tests	82
7.1.1.6	Statistische Anwendung	84
7.1.2	Etablierung von Grundlagen für verschiedene Methoden	84
7.1.2.1	Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat	84
7.1.2.2	Quantitative Analyse viraler Proteine der HCMV-infizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mittels Durchflusszytometrie	86
7.1.2.3	Erleichterte Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat durch primäre Fibroblasten	88
7.2	Diskussion der Ergebnisse	89
7.2.1	Die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 ist permissiv für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat	89
7.2.2	Inhibitorischer Effekt von Bortezomib auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	89
7.2.3	HCMV induziert zeitabhängig proapoptotische sowie antiapoptotische Effekte bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	90
7.2.4	Bortezomib induziert zeitabhängig antiapoptotische sowie proapoptotische Effekte bei der HCMV-infizierten und nichtinfizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	93
7.2.5	Die Ko-Kultur der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit Fibroblasten induziert verminderte proapoptotische Effekte	95
8	Literaturverzeichnis	99

9	Anhang	115
9.1	Proliferationsanalysen der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301	115
9.2	Bestimmung der EC ₅₀ von Bortezomib, (S)-MG132 und (R)-MG132	116
9.3	Bestimmung der CC ₅₀ von Bortezomib und (S)-MG132	117
9.4	Mikroskopische Darstellung nichtinfizierter Caco-2	118
9.5	Mikroskopische Darstellung des Einflusses von Proteasominhibitoren	119
Eidesstattliche Versicherung		122
Lebenslauf		123
Danksagung		124

Abbildungsverzeichnis

2.1	Adenom-Karzinom-Sequenzmodell der chromosomalen Instabilität im kolorektalen Karzinom	6
2.2	Das Humane Cytomegalievirus	13
2.3	Vereinfachte schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS)	19
2.4	Mechanismen der Proteasominhibition unterschiedlicher Peptid-abgeleiteter Klassen	20
4.1	Mikroskopische Darstellung der verwendeten Zelllinien	24
4.2	Schematische Darstellung der verwendeten Proteasominhibitoren	28
5.1	Mikroskopische Darstellung des Effektes von EGTA bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	36
6.1	Qualitativer und quantitativer Nachweis der HCMV-Infektion bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mittels Detektion viraler Proteine	53
6.2	Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie	57
6.3	Sehr frühe Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	57
6.4	Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	59
6.5	Zeitabhängiges Proliferationsverhalten nichtinfizierter Caco-2	60
6.6	Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie	63
6.7	Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei 4-stündiger Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie	64
6.8	Sehr frühe Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	65
6.9	Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	67
6.10	Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels PicoGreen [®] -Assay	68
6.11	Mikroskopische Darstellung der Ko-Kultur der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit der primären Fibroblastenzelllinie HELF Fi301	69
6.12	Effekte der Ko-Kultur und Ko-Infektion auf die HCMV-Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	70
6.13	Mikroskopische Darstellung des Effektes der Ko-Infektion bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	72

6.14	Effekte von serumarmen Medium und Bortezomib bei längerer Anwesenheit bei den nichtinfizierten und HCMV-infizierten Ko-Kulturen analysiert mittels Western-Blot	74
6.15	Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Ko-Kulturen bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie	77
6.16	Proliferations- und Vitalitätseffekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2-Mono-Kulturen und Ko-Kulturen bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib	78
7.1	Quantitativer Nachweis des viralen Proteins pp28 der HCMV-infizierten Caco-2 bei Anwesenheit verschiedener Proteasominhibitoren	87
7.2	Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 sowie HELF Fi301 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium detektiert mittels Cell Death Detection ELISA ^{Plus}	97
9.1	Proliferation und Vitalität der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301	115
9.2	Einfluss von Bortezomib, (S)-MG132 und (R)-MG132 auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 .	116
9.3	Einfluss von Bortezomib und (S)-MG132 auf die Zellproliferation der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	117
9.4	Mikroskopische Darstellung nichtinfizierter Caco-2	118
9.5	Mikroskopische Darstellung des Einflusses von Bortezomib auf HCMV-infizierte und nichtinfizierte Caco-2	120

Tabellenverzeichnis

5.1	Definierte Zellzahlen für die Untersuchung von Proliferation und Vitalität der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301	33
5.2	Bestimmung der MOI für die Infektion von Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat	35
5.3	Definierte Arbeitskonzentrationen der Proteasominhibitoren	37
5.4	Einstellungen des BD FACSCalibur™ für die Detektion der viralen Proteine IE1/IE2 und pp28	48
5.5	Definierte Behandlungszeiträume von Caco-2-Mono-Kulturen und Ko-Kulturen mit Bortezomib und (S)-MG132 verschiedener Konzentrationen	49
5.6	Einstellungen des BD FACSCalibur™ für die Detektion der FITC-Annexin V/Propidiumiodid-Zellanalyse	50
6.1	Antivirale Aktivität von Proteasominhibitoren gegen das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2	53

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_M$	mitochondriales Membranpotential
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AEC	<i>3-Amino-9-ethylcarbazole</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>aqua bidest.</i>	<i>aqua bidestillata</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caco-2	<i>human colorectal adenocarcinoma cell line</i>
CAFs	<i>cancer-associated fibroblasts</i>
CC ₅₀	<i>cytotoxic concentration 50 %</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CI	<i>confidence interval</i>
CIMP	<i>cytosine (C)-p-guanine (G) island methylator phenotype</i>
CIN	<i>chromosomal instability</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPE	<i>cytopathic effect</i>
CT-L	<i>chymotrypsin-like</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
d	<i>day(s)</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
DiOC ₆ (3)	<i>3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	<i>early</i>
EC ₅₀	<i>effective concentration 50 %</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EQ	Eckquadrat
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

gB	Glykoprotein B
GCV	Ganciclovir
h	<i>hour(s)</i>
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HELF	<i>human embryonic lung fibroblasts</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
hMLH	<i>human mutator (mut)L homolog</i>
hMSH	<i>human mutS homolog</i>
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
hPMS	<i>human postmeiotic segregation</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IE	<i>immediate early</i>
I κ B α	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IL	Interleukin
IMZ	intestinale mesenchymale Zellen
IR	<i>internal repeat</i>
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide</i>
JNK	<i>c-Jun-NH₂ terminal kinase</i>
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KRK	kolorektales Karzinom
L	<i>late</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MCP	<i>major capsid protein</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MIE	<i>major immediate early</i>
min	<i>minute(s)</i>
MMR	<i>mismatch repair</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MSI	<i>microsatellite instability</i>
MW	Mittelwert
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NIEPs	<i>non-infectious enveloped particles</i>
p. i.	<i>post infectionem</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFU	<i>plaque forming units</i>
PGPH	<i>peptidyl-glutamyl peptide hydrolase</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid

PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pp	Phosphoprotein
qRT-PCR	<i>quantitative real-time-PCR</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPE	<i>retinal pigment epithelial</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SI	Selektivitätsindex
SMAD	<i>MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4 (Drosophila)</i>
T-L	<i>trypsin-like</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TER	<i>transepithelial resistance</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TR	<i>terminal repeat</i>
u. a.	unter anderem
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
U _L	<i>unique long</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-Systeme
U _S	<i>unique short</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
Wnt	<i>wingless/int-1</i>
XTT	<i>sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate</i>
z. B.	zum Beispiel
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1 Abstract

Einleitung: Hinsichtlich einer Assoziation zwischen dem Humanen Cytomegalievirus (HCMV) und dem kolorektalen Karzinom ist die Studienlage kontrovers. HCMV, ein ubiquitäres Pathogen, hat zwecks Begünstigung seiner Vermehrung intrazelluläre Strategien zur Nutzung des Wirtsstoffwechsels entwickelt. Bisherige Forschungsergebnisse konnten diesbezüglich zeigen, dass der Proteasom-inhibitor MG132 die Replikation von HCMV bei den Fibroblasten inhibiert. Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung des spezifischen Proteasominhibitors Bortezomib auf die HCMV-Replikation sowie apoptotische/nekrotische Effekte in Gegenwart von HCMV und/oder Bortezomib bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 zu überprüfen.

Methoden: Für den Nachweis der Permissivität von Caco-2 für HCMV wurde die Expression des sehr frühen (IE1), frühen (pUL44) und späten (pp28) viralen Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Zur Überprüfung des Einflusses der Ko-Kultur und Ko-Infektion auf die Caco-2-HCMV-Infektion diente der Plaquereduktionsassay. Desgleichen erfolgte die Prüfung der antiviralen Wirkung von Bortezomib und (S)-MG132 (Kontrolle), verifiziert anhand der Durchflusszytometrie sowie indirekten Immunfluoreszenz. Zytotoxische Nebeneffekte konnten durch den Selektivitätsindex detektiert werden. Unter Verwendung von Durchflusszytometrie, JC-1-Assay, Cell Death Detection ELISA^{Plus} oder Western-Blot wurden apoptotische/nekrotische Effekte bei den nichtinfizierten und infizierten Caco-2-Mono- und Ko-Kulturen nach zeitabhängiger Behandlung mit serumarmen Medium und Bortezomib untersucht. Experimente zum Proliferationsverhalten erfolgten dementsprechend mithilfe des Trypanblau-Ausschlusstests.

Ergebnisse: Durch den Nachweis aller viralen Proteine, einschließlich Strukturproteine, konnte die Permissivität von Caco-2 für HCMV bewiesen werden. Die antivirale Aktivität beider Proteasominhibitoren war vermutlich mit zytotoxischen Nebeneffekten zu begründen. Der durch HCMV zunächst induzierte geringe proapoptotische Effekt bei den Caco-2 wurde im zeitlichen Verlauf antiapoptotisch. Zudem stabilisierte HCMV vermutlich frühzeitig das mitochondriale Membranpotential, welches die proapoptotische Wirkung von Bortezomib blockierte. Bei den nichtinfizierten Caco-2 zeigte Bortezomib einen leichten antiapoptotischen Effekt. Bei 7-tägiger Exposition bewirkte Bortezomib sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Caco-2 einen leichten zytotoxischen Effekt, welcher durch die Ko-Kultur ebenso vermindert wurde. Die Ko-Infektion der Tumorzellen mit HCMV-infizierten Fibroblasten führte zu hohen Infektionsraten nichtvorbehandelter Caco-2, wobei ein zellzahl- sowie titerabhängiger zytopathischer Effekt oder eine Proliferationssteigerung wahrscheinlich waren.

Schlussfolgerung: HCMV wirkte im zeitlichen Verlauf bei den Caco-2, bei unveränderten Zellumgebungsbedingungen, gering antiapoptotisch. Bortezomib induzierte einen leichten antiapoptotischen Effekt, der vermutlich zusätzlich HCMV-abhängig war. Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 26S-Proteasoms schien somit essentiell für die HCMV-Replikation bei den Zellen zu sein. Die bei längerer Exposition insgesamt bei den Caco-2 induzierte leichte zytotoxische Wirkung von Bortezomib wurde durch die Ko-Kultur gleichermaßen vermindert.

Schlüsselwörter: HCMV, Caco-2, antivirale Wirkung von Bortezomib, Apoptose, Ko-Kultur

Abstract

Introduction: The available evidence for an association between human cytomegalovirus (HCMV) and colorectal carcinoma is controversial. The ubiquitous pathogen HCMV has developed intracellular strategies for exploiting the host metabolism to promote its reproduction. Existing research results show that the proteasome inhibitor MG132 inhibits the replication of HCMV in fibroblasts. The aim of this study is to evaluate the effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on HCMV replication as well as apoptotic/necrotic effects in the presence of HCMV and/or bortezomib in the colorectal carcinoma cell line Caco-2.

Methods: To establish the HCMV permissiveness of Caco-2, the expression of the immediate early (IE1), early (pUL44) and late (pp28) viral protein was analysed by indirect immunofluorescence and flow cytometry. A plaque reduction assay served to determine the influence of co-culture and coinfection on Caco-2 HCMV infection. The antiviral effect of bortezomib and (S)-MG132 (control) was also investigated and verified by flow cytometry and indirect immunofluorescence. Cytotoxic side effects were detected by the selectivity index. Using flow cytometry, JC-1 assay, Cell Death Detection ELISA^{Plus} or Western blot analysis, apoptotic/necrotic effects in uninfected and infected Caco-2 monocultures and co-cultures were compared following time-dependent treatment with low-serum medium and bortezomib. Experiments on proliferation behaviour were conducted using the trypan blue exclusion test.

Results: HCMV permissiveness of Caco-2 was proven by detection of all viral proteins, including structural proteins. The antiviral activity of both proteasome inhibitors was likely due to cytotoxic side effects. The slight proapoptotic effect initially induced by HCMV in Caco-2 became anti-apoptotic in the further course. Additionally, HCMV likely stabilized the mitochondrial membrane potential early, which blocked the proapoptotic effect of bortezomib. In uninfected Caco-2, bortezo-

mib exhibited a slight antiapoptotic effect. After 7-day exposure, bortezomib had a slight cytotoxic effect in uninfected and infected Caco-2, which was also reduced by co-culture. Co-infection of tumour cells with HCMV-infected fibroblasts led to high infection rates of non-pretreated Caco-2, with a likely cell-count-dependent and titre-dependent cytopathic effect or proliferation increase.

Conclusion: Over time, under unchanged ambient conditions, HCMV had a slight antiapoptotic effect on Caco-2. Bortezomib induced a slight antiapoptotic effect, which was likely additionally HCMV-dependent. The chymotrypsin-like activity of the 26S proteasome therefore appeared essential for HCMV replication in the cells. The slight cytotoxic effect of bortezomib induced in Caco-2 following longer-term exposure was equally reduced by co-culture.

Keywords: HCMV, Caco-2, antiviral effect of bortezomib, apoptosis, co-culture

2 Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den häufigsten malignen Tumoren Deutschlands. Für das Jahr 2014 gab das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD), im Robert Koch-Institut, eine standardisierte Erkrankungsrate¹ für Frauen mit 35,7 (Prognose für 2018: 32,8) und für Männer mit 54,0 (Prognose für 2018: 50,6) sowie eine standardisierte Sterberate¹ entsprechend mit 12,8 und 21,0 an [1]. Im Jahr 2014 war das KRK die zweithäufigste Tumorlokalisation aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern sowie die dritthäufigste Tumorlokalisation aller Krebssterbefälle bei beiden Geschlechtern [2]. Das Erkrankungsrisiko ist bis ins hohe Alter ansteigend. Ein vergleichsweise hohes mittleres Erkrankungsalter von 75 (Frauen) sowie 72 Jahren (Männer) ist dem entsprechend. Jenseits des 70. Lebensjahres erkranken mehr als die Hälfte der Patienten, nur etwa 10 % vor dem 55. Lebensjahr. Seit dem Jahr 2003 ist ein Rückgang der altersstandardisierten Erkrankungsraten zu verzeichnen, der sich zuletzt noch verstärkt hat [1]. Weltweit werden einer Schätzung zufolge im Jahr 2018 über 1,8 Millionen neue Karzinomfälle und 881 000 Todesfälle auftreten. Die Inzidenz ist der deutschen Rangfolge für das Jahr 2014 entsprechend. In Bezug auf die Mortalität liegt das KRK bei Frauen an zweiter und bei Männern an dritter Stelle [3].

2.1.2 Definition und Ätiologie

Das KRK ist definiert als maligner, die Submukosa (*Tela submucosa*) infiltrierender Tumor aboral der Ileozäkklappe liegend [4]. Die Grenze zwischen Kolon und Rektum wird unterschiedlich eingeteilt. Nach dem internationalen Dokumentationssystem gelten als Rektumkarzinome Tumoren, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist. Die intraoperative Beurteilung erfolgt anhand des Endes der Tänen (*Taeniae coli*) oder der peritonealen Umschlagsfalte mit Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht und anderen Faktoren [5]. Im Jahr 2014 wurden laut ZfKD fast zwei Drittel der Erkrankungen im Kolon entdeckt. 26 % der Karzinomfälle der Frauen und 33 % der Fälle der Männer machen Krebserkrankungen des Rektums aus. Der Übergang zwischen Kolon und Rektum (Rektosigmoid) wird als Lokalisation immer seltener angegeben. Im Analkanal treten nur 1–2 % der Krebserkrankungen auf, wobei die Inzidenz jedoch steigend ist. Abgesehen von den überwiegenden Plattenepithelkarzinomen im Analbereich finden sich histologisch fast ausschließlich Adenokarzinome [1, 6].

Da die Ätiologie des KRK weiterhin unbekannt ist, wird von einer multifaktoriellen Genese

¹je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung

ausgegangen. Exogene und endogene Risikofaktoren wie Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel, ballaststoffarme Ernährung, Alkohol, der Genuss von rotem Fleisch sowie zunehmendes Alter zählen unter anderem (u. a.) zu den prädisponierenden Risikofaktoren [6–9]. Weiterhin sind Verwandte ersten Grades von Patienten mit KRK beziehungsweise (bzw.) Adenomen selbst überdurchschnittlich häufig betroffen sowie Patienten mit Adenomen [5]. Das KRK tritt ungefähr zu 70–85 % aller Fälle sporadisch auf, 20–30 % sind familiärer Ursache und 2–5 % hereditären Ursprungs [10, 11], bei 1 % bilden Inflammationen die Grundlage [12, 13].

Das autosomal-dominant vererbte *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC) (2–4 %) und die ebenso autosomal-dominant vererbte *familial adenomatous polyposis* (FAP) (circa (ca.) 1 %) sind die häufigsten Ursachen aller kongenital bedingten KRK. Charakteristisch für das HNPCC ist ein Lebenszeitrisko von 32–59 % für Frauen und 34–73 % für Männer, extrakolonische Tumormanifestationen, synchrone/metachrone Zweitkarzinome des Kolons und Rektums sowie die bevorzugte Tumorlokalisation im rechten Hemikolon. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 45 Jahren. Aufgrund fehlender bzw. minimaler Anzahl von Polypen erfolgt die Einteilung des HNPCC nach den Amsterdam-Kriterien I, II sowie den revidierten Bethesda-Kriterien. Ursächlich für das HNPCC ist eine Keimbahnmutation in einem der Gene des *deoxyribonucleic acid* (DNA)-*mismatch repair* (MMR)-Systems (Lynch-Syndrom) (*human mutator (mut)L homolog 1* (*hMLH1*) und *human mutS homolog 2* (*hMSH2*) (80–90 %), *hMSH6* und *human postmeiotic segregation increased 2* (*hPMS2*) (10–20 %)). Zusätzlich können Deletionen in dem vor dem *hMSH2*-Gen gelegenen *epithelial cell adhesion molecule* (*EpCAM*)-Gen (ca. 3 %) HNPCC verursachen. Die Folge der Mutation ist eine fehlerhafte DNA-Replikation während der Tumorzellteilung mit Nachweis variabler Längen von *simple sequence repeats* (SSR, Mikrosatelliten) (*microsatellite instability* (MSI) [14–16].

Die FAP wird durch eine Keimbahnmutation im *adenomatous polyposis coli* (*APC*)-Gen, ein Tumorsuppressorgen, auf Chromosom 5 (5q21-22) bei ungefähr 80-90 % der Patienten mit einer typischen FAP verursacht. Etwa die Hälfte der FAP-Patienten entwickeln multiple (> 100) Adenome ab dem 15. Lebensjahr und 95 % im Alter von 35 Jahren. Bei einem Teil der Patienten manifestiert sich die Erkrankung extrakolonisch. Da die Mehrheit der Patienten mit FAP zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr ein Karzinom entwickeln, ist die Kolektomie die Therapie der Wahl [11, 17].

2.1.3 Molekulare Mechanismen der Pathogenese

Für das Entstehen des sporadischen KRK sind auf genomischer Ebene mit der *chromosomal instability* (CIN) (*suppressor pathway*), der MSI (*mutator pathway*) und dem *cytosine* (C)-*p-guanine* (G) *island methylator phenotype* (CIMP) hauptsächlich drei molekulare Mechanismen bekannt [18, 19].

Die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein (1990), bei der die Gesamtakkumu-

lationen genetischer Alterationen der Proto-Onko- und Tumorsuppressorgene zur Transformation des normalen Epithels über adenomatöse Zwischenstufen zur Neoplasie führen [20] und damit der CIN zugrunde liegt, ist für ungefähr 60 % der sporadischen KRK verantwortlich [21]. Charakteristisch sind Zugewinne oder Verluste ganzer Abschnitte eines Chromosoms, welche u. a. zu einer Aneuploidie, einer Amplifikation sowie zu einem Verlust der Heterozygotie führen können. Die meisten KRK, wie auch die FAP, gehen von der biallelischen Inaktivierung des *APC*-Gens aus, die zu Störungen der chromosomalen Segregation sowie des zytoplasmatischen β -Catenin-Destruktionskomplexes *APC / Axin1 / glycogen synthase kinase-3 α/β (GSK-3) / casein kinase-1 (CK1)* führen. Das Versagen des Abbaus von β -Catenin mündet in eine erhöhte Induktion der *wingless/int-1 (Wnt)*-Signalisierung. Das im Zytoplasma akkumulierte β -Catenin transloziert in den Zellkern und induziert über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktorkomplex *T-cell factor / lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF)* die Transkription von Wnt-Zielgenen. Mit der Bildung von polyploiden Zellen, dem verlängerten Zellüberleben und der Hyperproliferation werden potentielle pathogene Mechanismen bei der Initiation der CIN angezeigt [18, 22–24]. Experimentelle Modelle lassen vermuten, dass früheste Adenom-Stadien durch *aberrant crypt foci (ACF)*, vornehmlich

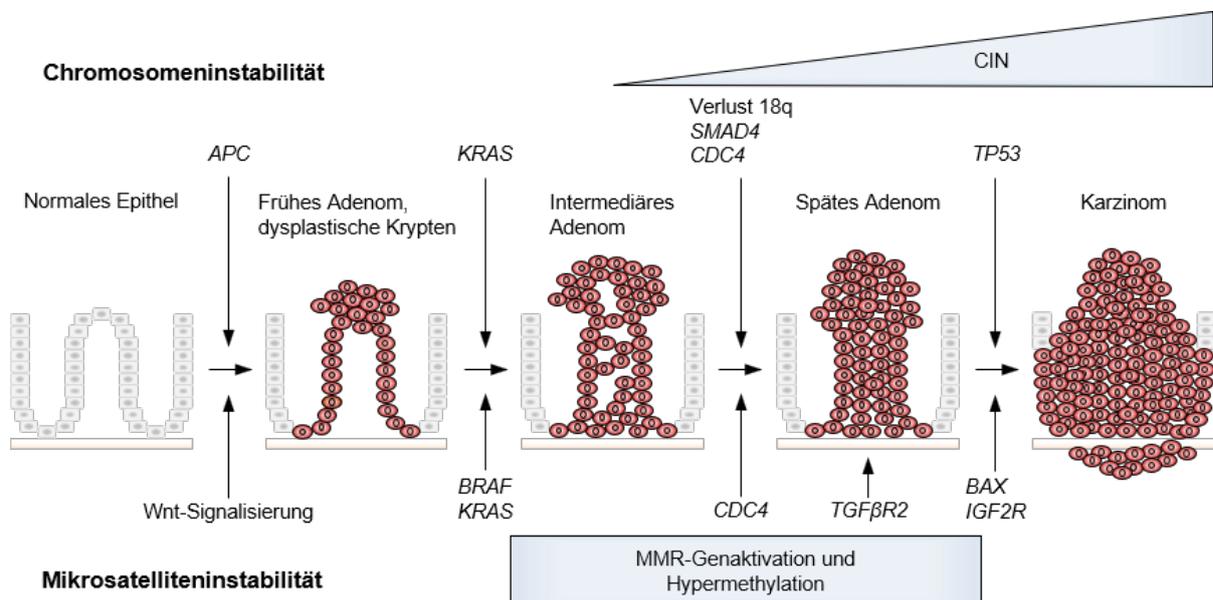


Abb. 2.1 Adenom-Karzinom-Sequenzmodell der chromosomalen Instabilität im kolorektalen Karzinom

Stark vereinfachte schematische Darstellung des Mehrstufenmodells ausgehend von der chromosomalen Instabilität (CIN), die durch verschiedene genetische Veränderungen zur Transformation des normalen Epithels über Zwischenstufen adenomatöser Polypen zum kolorektalen Karzinom führt (nach Walther *et al.* (2009) [25], erweitert entsprechend dem genetischen Modell zur kolorektalen Karzinogenese von Fearon und Vogelstein (1990) [20]). *APC* = adenomatous polyposis coli, *KRAS* = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, *SMAD4* = MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4 (*Drosophila*), *CDC4* = cell division control protein 4, *TP53* = tumor protein p53, Wnt = *wingless/int-1*, *BRAF* = B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, *TGF β R2* = transforming growth factor- β receptor 2, *BAX* = BCL2 associated X, *IGF2R* = insulin-like growth factor 2 receptor.

der dysplastische Subtyp, mit epithelialer Hyperzellularität, abnormen nukleären Merkmalen sowie ungeordneter Reifung, unter Beteiligung des oberen Bereichs des Kryptenepithels, gekennzeichnet sind [26]. Die Mutation im *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS proto-oncogene)*, die Deletion des langen Arms von Chromosom 18q (*deleted in colorectal carcinoma (DCC)*; *MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4 (Drosophila) (SMAD4)*; *SMAD2*) sowie die Mutation im *p53*-Gen auf Chromosom 17p sind mit einer schlechten Prognose bzw. hohem metastatischen Potential assoziiert [18, 20, 25].

Der MSI-Weg stellt eine Form der genomischen Instabilität dar, der an der Genese von etwa 15 % der sporadischen KRK sowie mehr als 95 % der HNPCC beteiligt ist. Die MSI wird über die Inaktivität des MMR-Systems, durch Mutationen u. a. in den Genen *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* sowie *hPMS2*, verursacht [18, 20]. Auf dessen Grundlage hat der MSI-Status eine therapeutische sowie prognostische Relevanz [5].

Der dritte Weg umfasst die epigenetische Inaktivierung mittels CIMP, der bei etwa 20–30 % der sporadischen KRK gefunden wurde. Dessen klinische Merkmale ähneln denen, die mit MSI assoziiert sind. Der Mechanismus basiert auf die 5'-Cytosin-Methylierung im CpG-Dinukleotid, lokalisiert in der Promotorregion der Gene, die u. a. für die Zellzyklusregulation, den genetisch programmierten Zelltod (Apoptose), die Angiogenese, die DNA-Reparatur sowie die Invasion verantwortlich sind. Die MSI ist dabei auf den Ausfall von *hMLH1* durch Methylierung des *hMLH1*-Promotors infolge somatischer Mutationen im *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase (BRAF)*, insbesondere der Mutation V600E, zurückzuführen, die bei 90 % der Karzinomfälle in den sessilen serratierten Adenomen, aber nicht in den herkömmlichen Adenomen erkannt wurde. Die *BRAF*-Mutation wird häufig in den CIMP-high-Tumoren identifiziert und ist mit einem erhöhten Zellwachstum, einer Progression der Karzinogenese und einer hohen Mortalität verbunden. Zur Unterscheidung zwischen einem HNPCC-assoziierten und einem sporadischen KRK kann neben dem MSI-Status die *BRAF*-Analyse Auskunft geben [5, 15, 18, 24].

2.1.4 Symptome und Diagnostik

Das KRK kennzeichnet klinisch eine uncharakteristische lokale Symptomatik mit rektalen Blutungen, plötzlich veränderten Stuhlgewohnheiten einschließlich unspezifischen Abdominalschmerzen und Ileus. Weiterhin können Allgemeinsymptome wie ungewollter Gewichtsverlust, Anämie-Symptomatik sowie paraneoplastische Syndrome auftreten. Eine fortgeschrittene Lebermetastasierung zeigt sich durch Ikterus und Leberinsuffizienz. Husten wie Dyspnoe weisen auf eine pulmonale und/oder pleurale Metastasierung hin. Selten treten Knochenschmerzen bei Skelettmetastasen und neurologische Symptome bei zerebraler Metastasierung auf [27]. Zum Zeitpunkt der Erstdiagno-

se eines KRK liegen bei 25 % der Patienten Fernmetastasen vor, wobei 19 % in der Leber, 9 % im Peritoneum und 3 % in der Lunge zu finden sind. Weitere Fernmetastasen in nichtregionären Lymphknoten, der Haut, des Ovars und der Knochen sind mit 1–2 % selten [5].

Die Diagnostik bei neu aufgetretener Symptomatik umfasst die digitale rektale Untersuchung und die komplette Koloskopie mit Biopsie. Für das Staging und die Therapieplanung wird die Abdomensonografie, die Computertomografie oder die Magnetresonanztomografie des Abdomens sowie das Röntgen und die Computertomografie des Thorax bzw. die Bestimmung des Carcinoembryonalen Antigens empfohlen [27].

2.1.5 Klassifikation, Therapie und Prävention

Die Einteilung des KRK in entsprechende Stadien ist nach den Vorgaben der *Union for International Cancer Control* (UICC) in der 6. Auflage der *tumor-node-metastasis* (TNM)-Klassifikation maligner Tumoren (2002) [28], erweitert in der 7. Auflage (2010) [29], angegeben. Auf dessen Grundlage sowie den Empfehlungen des aktuellen S3-Leitlinienprogramms (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF)), unter Berücksichtigung des Status praesens der Patienten, erfolgt die Therapie primär radikalchirurgisch mit kurativem Ziel. Bei Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im UICC-Stadium II ist eine adjuvante Chemotherapie fakultativ, in Risikosituationen wie einem T4-Tumor sollte sie jedoch als Monotherapie mit Fluoropyrimidinen erwogen werden. Bei Patienten mit einem R0 resezierten Kolonkarzinom im Stadium III ist eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin indiziert, bei Kontraindikationen kann auf eine Monotherapie mit Fluoropyrimidinen ausgewichen werden. Die kurative Therapie des Rektumkarzinoms erfordert in der Regel neben der Resektion des Primärtumors im Gesunden die partielle oder totale Entfernung des Mesorektums und damit des regionären Lymphabflussgebiets. Beim Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III ist die neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie, die eine 5-Fluorouracil-Monochemotherapie mit oder ohne Folinsäure beinhalten sollte, indiziert. Nach Abschluss der Primärtherapie sowie prätherapeutisch bei jedem Rektumkarzinom, Karzinomen des Stadiums IV, metachronen Fernmetastasen oder Lokalrezidiven sollte jeder Patient auf einer interdisziplinären Tumorkonferenz vorgestellt werden. Weitere Optionen beinhalten das therapeutische Vorgehen bei Metastasierung und in der palliativen Situation. Die Nachsorge umfasst im Stadium II und III diagnostische Methoden, die Rehabilitation und die Tertiärprävention. Jederzeit besteht für die Patienten die Möglichkeit, psychoonkologische Betreuungen zu nutzen [5]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit KRK liegt bei 64 %, mit besserer Prognose der Patienten mit Kolonkarzinom gegenüber den Patienten mit Rektumkarzinom [27].

Präventive Maßnahmen zielen auf die Vermeidung von Risikofaktoren hinsichtlich der Ernäh-

rung und Lebensgewohnheiten. Zusätzlich wird die Nutzung von Vorsorge/Früherkennungen für die asymptomatische Bevölkerung ab dem 50. Lebensjahr empfohlen. Im Regelfall beinhaltet diese die Koloskopie, mit Wiederholung im 10-Jahres-Rhythmus, sowie die obligate digital-rektale Untersuchung. Für die Vorsorge/Früherkennung symptomatischer Bevölkerung stehen, entsprechend den Risikogruppen, endoskopische Verfahren (Koloskopie, Sigmoidoskopie, Kapselkoloskopie), Stuhltests (fäkaler okkultur Bluttest, genetische Stuhltests, Pyruvatkinase M2) bzw. radiologische Methoden sowie besondere Vorsorgeprogramme zur Verfügung [5].

2.2 Einfluss der Fibroblasten im Tumormikrogewebe des kolorektalen Karzinoms

Dem zellulären Anteil der Tumormikroumgebung (Tumorstroma) des KKR sind zu über 60 % mesenchymale Zellen sowie Immunzellen, Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur zugehörig, welche, eingebettet in der extrazellulären Matrix (EZM), über stimulierende Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine oder der EZM mit den Tumorzellen interagieren. Die nichtzelluläre Komponente enthält EZM-Proteine wie Kollagene, Laminine, Fibronektine und Proteoglykane, die die Wechselwirkung zwischen Proteinen erleichtern und Liganden für Zelloberflächenproteine darstellen [30, 31].

Intestinale mesenchymale Zellen (IMZ) des normalen Darms, erzeugt durch Mesothelin-positive Zellen und möglicherweise Zellen der Neuralleiste, umfassen neben den in der *Lamina propria* residierenden Fibroblasten, charakterisiert durch die Marker Vimentin, *cluster of differentiation* (CD)90, *fibroblast-specific protein 1* (FSP1), *platelet-derived growth factor receptor* $_{\alpha}$ (PDGFR $_{\alpha}$) und *short stature homeobox 2* (SHOX2), u. a. subepitheliale Myofibroblasten, Perizyten, Knochenmark-abgeleitete mesenchymale Stroma- oder Stammzellen sowie glatte Muskelzellen. Die Funktion intestinaler Fibroblasten besteht neben der mechanischen Stützfunktion, Immunregulation und Aufrechterhaltung der EZM-Homöostase in der Regulation der epithelialen Proliferation sowie Differenzierung [30]. Verschiedene Wachstumsfaktoren wie beispielsweise der *keratinocyte growth factor* (KGF) oder der *acidic fibroblast growth factor* (aFGF), als Mitglieder der FGF-Familie, können die intestinale Epithelzellproliferation *in vitro* und *in vivo* erhöhen, der *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) ist dagegen ein potenter Inhibitor [32, 33].

Bei Darmläsionen lassen sich Fibroblasten durch Zytokine, Chemokine, reaktive Sauerstoffspezies, mechanische Belastungen oder Wachstumsfaktoren zu Myofibroblasten aktivieren, die in der Wundheilung sowie der Regulation von Inflammationen ihre Aufgaben finden. Versagt deren Rückkehr in den Ruhezustand durch Apoptose, können pathologische Zustände wie Gewebsfibrosen oder chronische Inflammationen induziert werden. Aufgrund anhaltender Dysregulationen der

normalen Gewebshomöostase werden Tumoren als Wunden betrachtet, die nicht heilen [30].

Während der Tumorinitiation erfolgt die Aktivierung und Akkumulation von *cancer-associated fibroblasts* (CAFs). Myofibroblasten sind die größte Quelle von CAFs, markiert durch Stressfasern, die *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) enthalten. Die Differenzierung von CAFs wird weitgehend durch die TGF- β -Signalisierung vermittelt. Die Fibroblasten-Myofibroblasten-Transition findet ebenso während der Homöostase statt, obwohl selten, da Myofibroblasten in der normalen Schleimhaut vermindert sind [30, 34]. Residierende Epithel- oder Endothelzellen können als Quelle für CAFs über die *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) und die *endothelial-mesenchymal transition* (EndoMT) fungieren. Knochenmark-abgeleitete Zellen, einschließlich hämatopoetischer oder mesenchymaler Stammzellen und Fibrozyten, werden ebenfalls durch TGF- β sowie *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12) für die Entwicklung von CAFs rekrutiert. Die Herkunft der CAFs ist dennoch nicht vollständig geklärt [30].

In-vitro- und *In-vivo*-Studien konnten zeigen, dass aktivierte IMZ, CAFs und deren Subtypen direkt sowie durch Veränderungen der Tumormikroumgebung die Eigenschaften von präneoplastischen Zellen oder Karzinomzellen beeinflussen und damit zur Förderung von Inflammation, Karzinogenese, Tumorprogression und Metastasierung beitragen. IMZ und CAFs können zum Beispiel (z. B.) für die tumorassoziierte Angiogenese über die Sekretion des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), des KGF sowie des FGF2 nicht nur die Proliferation und Bildung von Endothelien fördern, sondern deren Vorläufer aus dem Knochenmark rekrutieren [30, 35]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Myofibroblasten über die Sekretion des *hepatocyte growth factor* (HGF) die Klonogenität von Tumorstammzellen, β -Catenin-abhängig, aktivieren [36]. CAFs sind in aggressiven KKR durch eine hohe Produktion von Kollagen I mit der EMT assoziiert und stimulieren vermutlich die Tumorzellinvasion [37]. Darüber hinaus sind mit Chemotherapeutika behandelte CAFs in der Lage, reichlich Interleukin (IL)-17A zu produzieren, wodurch die therapeutische Resistenz der Tumor-initiiierenden Zellen sowie deren protumorigenes Verhalten zunimmt [38]. TGF- β -stimulierte CAFs, die IL-11 sezernieren und damit die *glycoprotein 130 / signal transducer and activator of transcription 3* (gp130/STAT3)-Signalisierung in den Tumorzellen triggern, können mit diesem Crosstalk den metastasierenden Karzinomzellen einen Überlebensvorteil zur Verfügung stellen [34].

2.3 Das Humane Cytomegalievirus

2.3.1 Taxonomie

Das Humane Cytomegalievirus (HCMV), auch als Humanes Herpesvirus 5 (HHV 5) bezeichnet, gehört zur Familie der *Herpesviridae*, Unterfamilie β -*Herpesvirinae*, Gattung *Cytomegalovirus*.

Die Einteilung der *Herpesviridae* beruht auf der Klassifikation durch die *Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Charakteristisch für die Unterfamilie β -*Herpesvirinae* sind der prolongierte Replikationszyklus und eine langsame Ausbreitung der Infektion von Zelle zu Zelle *in vitro* sowie eine ausgeprägte Spezies- und Zelltypspezifität und der *cytopathic effect* (CPE) der Virusinfektion, welcher durch Bildung von intranukleären und intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen hervorgerufen wird und zum Anschwellen der infizierten Zelle (Zytomegalie) führt. Im Zellkern erfolgen die DNA-Replikation und die Nukleokapsidformation. Vertreter dieser Untergruppe können in latenter Form in lymphoretikulären Zellen und möglicherweise in sekretorischen Drüsen, Nieren und anderen Geweben persistieren [39, 40].

2.3.2 Medizinische Aspekte

HCMV ist ein ubiquitär vorkommendes Pathogen mit einer großen Variationsbreite in Abhängigkeit vom Lebensalter und geographischen bzw. die Transmission begünstigenden sozioökonomischen Standards der untersuchten Populationen [41, 42]. Die HCMV-Epidemiologie fokussierte sich auf Frauen im gebärfähigen Alter, da die Primärinfektion während der Schwangerschaft von wichtiger medizinischer Relevanz ist. Die Prävalenz der HCMV-Infektion wird für diese Population mit 52–84 % für europäische Länder, für die USA und Brasilien angegeben, für Japan, Südkorea, Benin und die Türkei mit 95–99 %. Für die USA wurde eine populationsbasierte Schätzung der Prävalenz der HCMV-Infektion aus den statistischen Erhebungen der *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) III (1988–1994) und NHANES 1999–2004 abgeleitet. Die altersstandardisierte Prävalenz der HCMV-Infektion lag weiterhin bei etwa 59 %, wobei ungefähr die Hälfte der US-Bevölkerung im Alter von 6–49 Jahren infiziert wurde. Darüber hinaus waren mehr weibliche Personen (63,5 %) als männliche (54,1 %) und mehr nichthispanische dunkelhäutige Personen (75,8 %) sowie mexikanische Amerikaner (81,7 %) als nichthispanische hellhäutige (51,2 %) infiziert [39]. Zu einer Manifestation der HCMV-Infektion kommt es zumeist im Kindesalter, in den Entwicklungsländern mit einer ca. 90%igen Seroprävalenz [43, 44].

Die Virusübertragung erfolgt horizontal durch direkten Schleimhautkontakt mit infizierten Körperflüssigkeiten wie Tränenflüssigkeit, oropharyngeale und zervikovaginale Sekrete, Spermien oder Urin [39, 45] sowie durch die Transplantation von Zellen, Geweben, soliden Organen oder durch die Transfusion von Blut [39]. Von der Mutter auf das Kind (maternale Virustransmission) wird das Virus im Wesentlichen über den intrauterinen (transplazentar), perinatalen (*intra partum*) sowie postnatalen (Muttermilch) Weg übertragen. Die Transmission über die Muttermilch ist dabei der häufigste Weg, jedoch ist die transplazentare Übertragung der medizinisch wichtigste [39]. Die Transmissionsrate nach Primärinfektion von Schwangeren beträgt 32,3 %, bei rezidivierender Infek-

tion hingegen 1,4 % [46]. HCMV ist für die meisten kongenitalen Infektionen weltweit ursächlich, die bei 0,3–1,3 % und bei 2 % bis ungefähr 4 % der Neugeborenen der Industrieländer bzw. der Entwicklungsländer auftritt [39]. Von den infizierten Neugeborenen weisen ca. 10 % Komplikationen wie Chorioretinitis, Hepatitis, Hepatosplenomegalie, Pneumonie, intrauterine Wachstumsretardierung oder Mikrozephalie auf [47, 48]. Weitere 15 % entwickeln Spätschäden, beispielsweise Schallempfindungsschwerhörigkeit, Taubheit oder geistige Retardierung [49–51].

Bei immunkompetenten Personen verläuft eine Primärinfektion zumeist inapparent [52]. Die zellassozierte Virusreplikation kann in mononukleären Zellen, Lymphozyten, Epithelzellen, Endothelzellen oder Parenchymzellen erfolgen [53], eine langanhaltende Replikation vornehmlich in Epithelzellen von Speicheldrüsen und Nieren. Nach der Primärinfektion persistiert HCMV latent im Wirtsorganismus u. a. vermutlich in myeloiden CD34⁺-Progenitorzellen und zirkulierenden Monozyten [39]. Durch Stress oder systemische Entzündungen kann das Virus reaktiviert werden, der Verlauf gestaltet sich meist symptomfrei. Selten präsentiert sich ein Mononukleose-ähnliches Krankheitsbild mit zervikaler Lymphadenopathie, persistierendem Fieber, Myalgie, Arthralgie sowie hepatischer Symptomatik [52, 54].

Bei immunkompromittierten Patienten kann eine HCMV-Primärinfektion zu vermehrten Reaktivierungen führen. Schwere Krankheitsbilder wie Retinitis, Gastroenteritis, Colitis sowie eine lebensbedrohliche interstitielle Pneumonie oder Enzephalitis können sich nach Organtransplantationen oder im Rahmen von Infektionen, z. B. in Abhängigkeit von der Schwere des Verlaufs einer *human immunodeficiency virus* (HIV)-Infektion, manifestieren [55–58].

Für die Therapie von HCMV-Infektionen werden momentan die Nukleosid-Analoga Ganciclovir [59] und Valganciclovir [60] oder Cidofovir [61] sowie das Pyrophosphat-Analogon Foscarnet [62] eingesetzt, die die virale DNA-Synthese inhibieren. Nebenwirkungen wie Knochenmark- oder Nephrotoxizität [60, 63] sowie die Gefahr der Selektion resistenter Virusmutanten [64, 65] erweisen sich als nachteilig. Für die Prophylaxe einer HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung bei adulten HCMV-seropositiven Empfängern einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation wurde für PREVYMIS[®] (Wirkstoff Letermovir, Merck Sharp & Dohme Limited) am 08.11.2017 durch die *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) [66] die Zulassung für die USA erteilt sowie am 08.01.2018 durch die *European Medicines Agency* (EMA) [67] für die gesamte Europäische Union. Das Virostatikum Letermovir interagiert mit der Untereinheit pUL56, der größeren der beiden Untereinheiten des viralen DNA-Terminase-Komplexes. Damit wird die Bildung von Genomen einheitlicher Länge beeinflusst und die Reifung der Virionen beeinträchtigt. Bei Säugetieren gibt es zu diesem virusspezifischen DNA-Terminase-Komplex kein vergleichbares Enzymsystem. Somit entstehen mit Letermovir keine Toxizitäten aufgrund einer unerwünschten Hemmung entspre-

chender zellulärer Funktionen beim Menschen [68]. Zum jetzigen Zeitpunkt steht kein geeigneter Impfstoff zur Verfügung. In experimentellen und klinischen Studien [69] werden Impfstoffe auf Grundlage immunogener Zielstrukturen getestet, die das virale Glykoprotein B (gB) sowie das Tegumentprotein pp65 [70] bzw. den gH/gL-Pentamer-Komplex [71] beinhalten. Weiterhin stellen subvirale *dense body*-Vakzine eine Basis zur Entwicklung eines Impfstoffs dar [72]. Bei Schwangeren mit Primärinfektionen wird die Gabe von HCMV-Hyperimmunglobulin derzeit in klinischen Studien evaluiert [73].

2.3.3 Morphologie

Im Inneren des 150–200 nm großen Virions des HCMV befindet sich das doppelsträngige, lineare DNA-Genom, organisiert als *core* [74] und umschlossen von dem aus 162 Kapsomeren bestehenden ikosaedrischen Kapsid, welches von der Virushülle umgeben ist. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich eine unstrukturierte Proteinmatrix, die als Tegument bezeichnet ist. Bislang konnten dem Tegument etwa 20 virale Proteine zugeordnet werden mit Funktionen bei der Morphogenese [75–77], dem Virustransport [78], der Immunmodulation [79, 80] oder der Initiation der viralen Genexpression [81, 82]. In die Hüllmembran sind komplexartig organisierte virale Glykoproteine eingelagert. Der Glykoproteinkomplex I ist ein Homodimer des Glykoproteins gB [83]. Die Glykoproteine gM und gN bilden den Glykoproteinkomplex II [84]. Der Glykoproteinkomplex III besteht aus den Glykoproteinen gH, gL und gO [85, 86]. Die Glykoproteinkomplexe sind an der Virusadsorption, der Fusion von Virushülle und Plasmamembran sowie der Zell-Zell-Fusion beteiligt. Neben infektiösen Virionen werden bei der Virusreplikation auch nichtinfektiöse Partikel, *dense bodies* oder *non-infectious enveloped particles* (NIEPs), gebildet. *Dense bodies* bestehen

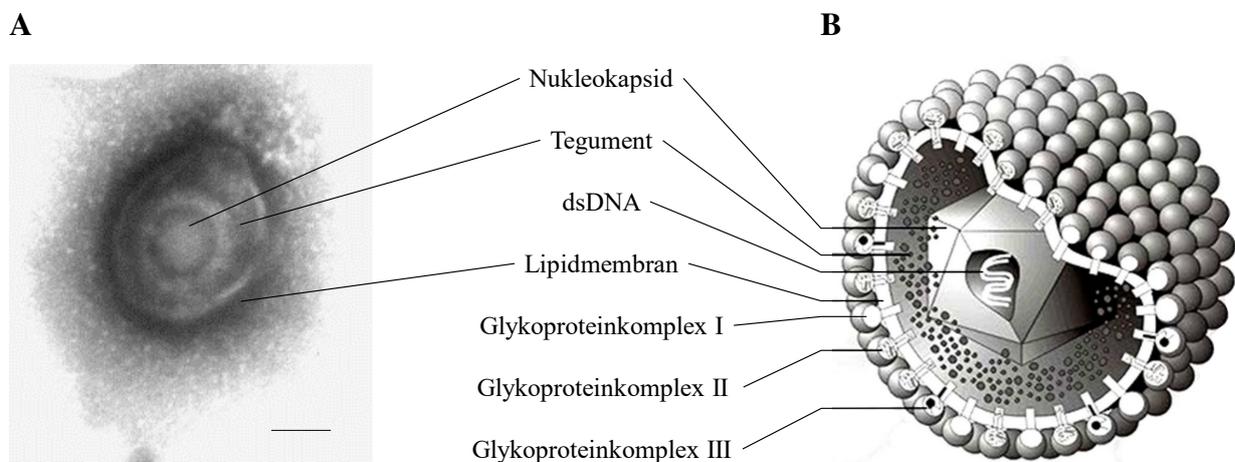


Abb. 2.2 Das Humane Cytomegalievirus

Elektronenmikroskopische (A) und schematische Darstellung (B) des Virions des Humanen Cytomegalievirus. Der Größenstandard entspricht 100 nm (nach Bogner (2002) [87], Schema modifiziert nach Tomtishen (2012) [75]).

nur aus der Hüllmembran und Tegumentproteinen, dagegen enthalten NIEPs zusätzlich ein Kapsid, aber keine virale DNA [88, 89].

Innerhalb der Familie der *Herpesviridae* besitzt das ca. 230 kbp große HCMV-Genom mit einem Molekulargewicht von 1.5×10^8 Dalton die größte Kodierungskapazität [90, 91]. Aufgebaut ist es aus zwei nichtrepetitiven Bereichen (*unique long* (U_L)- und *unique short* (U_S)-Segment), flankiert von repetitiven Sequenzen (*terminal repeats* (TR_L , TR_S) und *internal repeats* (IR_L , IR_S)). Die terminalen und internalen *a*-Sequenzen beinhalten Spaltungs- und Verpackungssignale. Durch intramolekulare Rekombination invertierter Wiederholungseinheiten können vier isomere Formen des Genoms entstehen, die in äquimolarem Verhältnis in allen HCMV-Populationen vorkommen [39, 92].

2.3.4 Infektionszyklus, virale Genexpression und Morphogenese

Im Zellkern erfolgt die zeitlich geordnete und kaskadenartig organisierte Expression des viralen Genoms unter Mitwirkung einer Vielzahl von zellulären Transkriptionsfaktoren [93]. In den ersten 30 *minutes* (min) nach Infektion der Wirtszelle beginnt die Transkription der sehr frühen Gene (*immediate early* (*IE*)) des Virus durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Das virale Tegumentprotein pp71 fungiert dabei als Transaktivator [94]. Die Mehrheit der *IE*-Gene werden in der sogenannten *major immediate early* (*MIE*)-Genregion exprimiert, zu der u. a. die offenen Leserahmen *UL122* und *UL123* gehören, kontrolliert durch den *MIE*-Promotor und dessen Enhancers [95]. Die am stärksten exprimierten *MIE*-Proteine sind *IE1* und *IE2*, die die Transkription der frühen (*early* (*E*)) und späten (*late* (*L*)) viralen Gene induzieren und die Expression zahlreicher zellulärer Proteine beeinflussen [96]. In der nachfolgenden frühen Phase (3–36 *hours* (h) *post infectionem* (p. i.)) wird der größte Teil viraler Gene transkribiert, wobei frühe Gene für Proteine kodieren, die z. B. an der Immunevasion beteiligt sind [97, 98]. Zu den frühen Proteinen gehören u. a. die virale DNA-Polymerase pUL54 und deren Prozessivitätsfaktor pUL44. Die Replikation des Genoms (ab 14–16 h p. i.) erfolgt nach dem *rolling circle*-Prinzip [39, 92, 99] in Zellkernarealen, die als Replikationszentren bezeichnet sind [100, 101]. Im Anschluss werden die späten Gene transkribiert. Die exprimierten Proteine sind in *early late*- und *true late*-Proteine unterteilt. Strukturproteine wie Kapsid-, Tegument- und Membranproteine gehören zu den späten Genprodukten [97]. Hauptbestandteil viraler Kapside ist das *major capsid protein* (*MCP*) wohingegen das mengenhäufigste Tegumentprotein pp65 (*UL83*) ist, welches diagnostisch zum Nachweis einer HCMV-Infektion genutzt wird [102]. Mittels immunogenen Tegumentprotein pp28, kodiert von *UL99*, erfolgt die finale Membranhüllung der HCMV-Partikel im Zytoplasma [103].

Die Morphogenese beginnt im Zellkern der Wirtszelle mit der Assemblierung von Kapsidproteinen zu Prokapsiden. Die Spaltung konkatemerer viraler DNA in einzelne Genomeinheiten erfolgt

durch die Nuklease-Aktivität der kleinen Untereinheit pUL89 der viralen Terminase. Die große Untereinheit pUL56, welche die Bindung zwischen DNA und Prokapsid vermittelt, stellt mit der ATPase-Aktivität die Energie für die Insertion der DNA in die Prokapside bereit [104–107]. Bei korrekter Verpackung erfolgt die Bildung von C-Kapsiden [108]. Elektronenmikroskopisch werden davon DNA-freie A-Kapside, vermutlich durch abortive DNA-Verpackung, sowie ebenfalls DNA-freie B-Kapside, Assemblierungsintermediate, die ein als *scaffolding protein* bezeichnetes Gerüstprotein enthalten, unterschieden [108, 109]. Eine erste Knospung der C-Kapside bzw. Nukleokapside erfolgt an der inneren Kernmembran. Die temporär umhüllten Nukleokapside werden durch Fusion mit der äußeren Kernmembran in das Zytoplasma entlassen [110–112]. Hierauf folgt die Anlagerung weiterer Tegumentproteine sowie die finale Umhüllung der Kapside an den Zisternen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks, in deren Membranen virale Glykoproteine integriert sind [113, 114]. Reife Viruspartikel werden mittels Exozytose ab 72 h p. i. aus der Zelle freigesetzt [115].

2.4 Nachweis und Einfluss des Humanen Cytomegalievirus im kolorektalen Karzinom

In der Literatur wird eine Assoziation zwischen HCMV und KRK kontrovers diskutiert. Die Einzelheiten dieses Zusammenhanges sind nach wie vor unklar, da die verwendete Methodik und/oder die Anzahl der untersuchten Populationen zu widersprüchlichen Studienergebnissen geführt haben [116, 117].

Huang und Roche (1978), die zuerst einen Bezug zwischen HCMV und KRK vermuteten, zeigten bei vier von sieben Tumorproben sowie angrenzendem Normalgewebe einer Tumorprobe HCMV-DNA anhand der membran-komplementären RNA-DNA-Hybridisierung [118]. 1981 analysierten die gleichen Autoren mittels Cot-Hybridisierung bei vier von 13 Tumorproben HCMV-DNA wie auch bei benachbarten Darmgewebe von sechs Fällen [119]. Hart *et al.* (1982) konnten durch die *In-situ*-Hybridisierung unter Verwendung von ³H-markierter CMV-DNA als Sonde und die Immunfluoreszenz keine viralen Nukleinsäuren oder Antigene bei 14 Tumorproben von Patienten mit Adenokarzinom des Dickdarms oder Rektums analysieren und schlossen daraus, dass HCMV wahrscheinlich nicht zu einer Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps der Adenokarzinomzellen beiträgt [120]. Rüger und Fleckenstein (1985) wiesen mithilfe des Southern-Blots bei hoher Empfindlichkeit mit molekular klonierter HCMV-DNA gleiche Mengen an HCMV-DNA bei Tumorgeweben wie bei angrenzenden Normalgeweben (n = 38) nach und spekulierten, dass HCMV-DNA-Fragmente in der Lage sein könnten, kolorektale Epithelien durch den „*hit and run*“-Mechanismus [121] zu transformieren, welches zu einer Entwicklung von Tumoren ohne

nachweisbare Spuren von persistierendem Virus führt [122].

Harkins *et al.* (2002) zeigten durch Untersuchungen von 29 Gewebeproben (Tumoren, Polypen, benachbarte Normalgewebe), anhand der Immunhistochemie, der *In-situ*-Hybridisierung sowie der *polymerase chain reaction* (PCR), dass HCMV-Proteine und Nukleinsäuren spezifisch in Tumorproben lokalisiert sind, aber nicht in benachbarten nichtneoplastischen Geweben. Dabei war die Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Immunreaktivität ko-lokalisiert mit IE1-72 und pp65 der gleichen Tumorproben [117]. Knösel *et al.* (2004) postulierten, dass HCMV keine Assoziation mit einer Tumorprogression bzw. Metastasierung des KKK zeigt. Untersuchungen der Proben von Primärtumoren (n = 57) und Metastasen (n = 20) belegten, dass nur bei 7 % (n = 4) der Primärtumorproben eine Expression von HCMV-DNA mittels PCR nachweisbar war. Die immunhistochemische Analyse der kolorektalen Karzinomproben ließ, unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers E-13, eine granuläre zytoplasmatische Färbung bei drei Proben der Primärtumoren erkennen. Einer dieser Tumore wurde durch die PCR als HCMV-positiv analysiert. Allerdings erfolgte keine Beobachtung der Färbung in den Kernen. Die Zellen zeigten zudem nicht die typische Morphologie, die normalerweise bei der HCMV-Infektion zu sehen ist. Entsprechend den Herstellerrichtlinien werteten die Autoren diese Färbung als unspezifisch [123].

Die Ergebnisse wurden von Akintola-Ogunremi *et al.* (2005) erhärtet. Die Autoren analysierten Proben von Tumoren (n = 51), Adenomen (n = 65), hyperplastischen Polypen (n = 23) und normal erscheinenden Darmgeweben (n = 77) anhand der Immunhistochemie und *nested*-PCR. Im Vergleich zu der Positiv-Kontrolle (Probe einer CMV-Kolitis) konnte bei Proben von Tumoren, Adenomen und hyperplastischen Polypen durch die immunhistochemische Analyse mittels zweier Antikörpergemische, die die sehr frühen, frühen und verzögerten Genprodukte von HCMV erkennen, keine nukleäre Positivität festgestellt werden. Eine fokale und schwache zytoplasmatische Färbung zeigte sich, insbesondere bei Verwendung höherer Antikörperkonzentrationen, bei einer Untergruppe der Fälle. Da die Färbung daneben bei Proben normal erscheinender Darmschleimhaut beobachtet wurde, kamen die Autoren zu der Annahme, dass diese Färbung als unspezifisch zu beurteilen war. Darüber hinaus konnte bei 24 selektierten Fällen mit positiver zytoplasmatischer Immunfärbung durch die PCR kein Nachweis genomischer HCMV-DNA verifiziert werden. Die Autoren diskutierten, dass die Ergebnisse jedoch die Möglichkeit eines „*hit and run*“-onkogenen Mechanismus nicht ausschließen, basierend auf vorhergehenden experimentellen Beobachtungen. In den meisten HCMV-transformierten Zellen wurde keine virale DNA detektiert, was darauf hindeutet, dass die Retention von HCMV-DNA für den transformierten Phänotyp nicht wesentlich ist. Einige der HCMV-Proteine werden nur transient exprimiert und besitzen mutagenes Potential, welches im Wirtsorganismus zu einer Transformation führen kann [124, 125]. Die Beobachtungen

von Mariguela *et al.* (2008) sowie Bender *et al.* (2009) deuteten ebenso darauf hin, dass es keinen Hinweis auf eine direkte Verbindung zwischen dem HCMV und dem KRK gibt, lassen aber eine Auslösung onkogener Differenzierung durch HCMV in Abhängigkeit von der Präsentation des „*hit and run*“-Mechanismus nicht unberücksichtigt [126, 127].

Chen *et al.* (2012) zeigten mittels PCR den Nachweis einer HCMV-DNA-Rate von 42,3 % bei den Tumorproben (n = 163), während nur 5,6 % der benachbarten nichtneoplastischen Proben (n = 163) positiv für HCMV waren. Durch die *quantitative real-time* (qRT)-PCR und *In-situ*-Hybridisierung konnte insgesamt das Ergebnis verifiziert werden [128]. Die von Dimberg *et al.* (2013) mithilfe der qRT-PCR analysierten HCMV-DNA-Raten schwedischer (n = 119) und vietnamesischer (n = 83) Kolon- und Rektumkarzinom-Proben (Stage I–IV, *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)) waren signifikant erhöht im Vergleich zu den angrenzenden Normalgeweben. Die Rate der HCMV-DNA vietnamesischer Tumorproben mit 39,8 % bestätigte die Höhe der Rate, die Chen *et al.* (2012) bei taiwanischen Tumorproben bestimmten. Im Gegensatz dazu waren 15,1 % der schwedischen Tumorproben positiv für HCMV. Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der Studien somit einen möglichen Zusammenhang von HCMV und KRK, wobei der ethnische Hintergrund vermutlich eine Rolle spielt [129]. Tafvizi und Fard (2014) bestärkten die gewonnenen Resultate. Von 50 Tumorproben iranischer Patienten mit KRK wurde bei 30 % mittels *nested*-PCR HCMV-DNA detektiert, dagegen waren bei den nichtneoplastischen Gewebeproben (n = 50) 10 % positiv für HCMV [116].

Chen *et al.* (2014) konnten nachweisen, dass die Anwesenheit von HCMV im KRK älterer Patienten (> 65 Jahre) mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist. Von 81 chirurgisch kurativ behandelten Patienten war das krankheitsfreie Überleben der 39 Patienten mit einem HCMV-positiven Tumor im Vergleich zu denjenigen mit einem HCMV-negativen Tumor signifikant verkürzt. Weiterhin wurde ein erhöhter intratumoraler IL-17-Level bei den HCMV-positiven (n = 5) gegenüber den HCMV-negativen Tumoren (n = 5) (UICC II) analysiert. TH17-Zellen, welche IL-17 produzieren, spielen eine entscheidende Rolle bei der Schleimhautimmunität, wobei ihre Aktivierung mit einem schlechten Outcome korreliert. Darüber hinaus ist wahrscheinlich das Alter ein wichtiger Faktor, welches sowohl das Outcome von Patienten mit KRK als auch den Status der HCMV-Infektion beeinflusst [130]. Die HCMV-Reaktivierung könnte dabei auf Virus-Karzinom-Wechselwirkungen in der Tumormikroumgebung zurückzuführen sein [131]. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass die Immunoseneszenz anstatt der zunehmend bewiesenen HCMV-bezogenen Onkomodulation für das Ergebnis verantwortlich ist [130].

Nachfolgend untersuchten die gleichen Autoren (2016) den Zusammenhang zwischen HCMV und dem Outcome jüngerer Patienten (< 65 Jahre) (n = 31) mit dem Nachweis einer insgesamt,

sowie im Tumorstadium UICC III, signifikanten günstigeren krankheitsfreien Überlebensrate vergleichend zu den Patienten mit einem HCMV-negativen Tumor ($n = 58$). Eine HCMV-Infektion der Karzinomzellen kann möglicherweise zelluläre Signale des Zellwachstums und der Metastasierung abschwächen und die Antitumor-Immunantwort in der Tumor-Mikroumgebung aktivieren. Signifikant verminderte Raten von IL-1 und COX-2 wurden bei HCMV-positiven gegenüber HCMV-negativen Tumoren detektiert [132]. Bei älteren Patienten induziert HCMV dagegen schädliche Mechanismen, die möglicherweise eine lokale Immunoseneszenz im Tumormikromilieu oder eine unausgewogene Immunantwort umfassen. Signifikante intratumorale Inflammationen wurden dabei häufiger bei HCMV-positiven Tumoren beobachtet [130]. Zusammenfassend suggerierten die Ergebnisse beider Studien, dass HCMV einen dualen onkomodulierenden Effekt, in Abhängigkeit vom Alter des Patienten, im KRK induziert [132]. Bai *et al.* (2016) nutzten u. a. Daten der oben dargestellten Studien, um durch Anwendung metaanalytischer Techniken die Prävalenz von HCMV in den Tumorgeweben sowie die Beziehung zwischen HCMV und dem KRK-Risiko zu erforschen. Dabei betrug die Gesamtprävalenz der HCMV-DNA in den Tumorgeweben 27,5 % (95 % *confidence interval* (CI) = 17,2–37,8 %). Die Tumorgewebe wiesen eine signifikante höhere Virusinfektionsrate im Vergleich zu den angrenzenden normalen Geweben auf (Odds-Ratio = 6,59; 95 % CI = 4,48–9,69; $I^2 = 0$ %; $P = 0,71$). Zusammenfassend deuteten die Autoren aus den Ergebnissen der Studie, dass eine HCMV-Infektion statistisch mit einem erhöhten KRK-Risiko assoziiert war sowie eine Rolle bei der Initiierung und Progression des KRK spielte [133].

2.5 Klassifikation und Wirkungsweise der Proteasominhibitoren

Mithilfe spezifischer Proteasominhibitoren konnte das katalytische Zentrum (20S-Untereinheit, Kern oder 20S-Proteasom) des 26S-Proteasoms eukaryotischer Zellen charakterisiert und der Einfluss des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) auf zelluläre Prozesse identifiziert werden. Neben dem selektiven Abbau gealterter, mutierter, fehlgefalteter bzw. geschädigter Proteine spielt das UPS durch die gezielte Eliminierung regulatorischer Proteine eine essentielle Rolle bei der Kontrolle der Zellzyklusprogression, der Apoptose oder der Inflammation [134–136]. In diesem Zusammenhang wurden initial antineoplastische Effekte unterschiedlicher Proteasominhibitoren an hämatologischen sowie nichthämatologischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Karzinommodellen im Hinblick einer möglichen Therapie von Karzinomerkrankungen untersucht [137].

Die wichtigsten selektiven Proteasominhibitoren lassen sich bezüglich der chemischen Gruppen in Peptid-Aldehyde, Peptid-Boronate, Peptid-Vinylsulfone, Peptid-Epoxyketone und Nichtpeptide einteilen. Selektive Proteasominhibitoren bilden kovalente Bindungen mit den N-terminalen Threonin-Resten der β -Untereinheit des 20S-Proteasoms [134]. Dem Vorkommen entsprechend

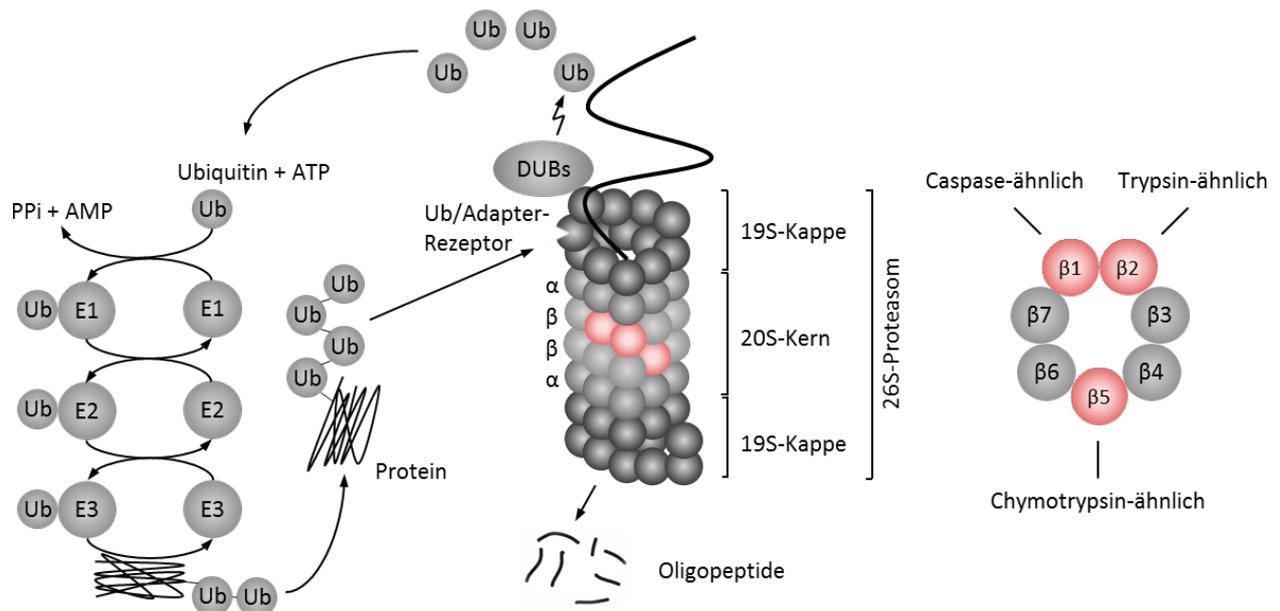


Abb. 2.3 Vereinfachte schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS)

Das UPS degradiert die durch Polyubiquitinketten markierten Zielproteine. Freies Ubiquitin wird dazu durch die Bindung an das Enzym E1 ATP-abhängig aktiviert und anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Durch die E3-Ubiquitin-Ligasen wird nach Übernahme der Ubiquitineinheit die Modifizierung der Zielsubstrate bewirkt. Die 19S-Untereinheit (Kappe) des 26S-Proteasoms bindet die Substrate. Nach der Proteinfaltung erfolgt die Translokation in die 20S-Untereinheit (Kern), die aus vier aneinandergelagerten Ringen besteht. Die äußeren α -Ringe ($\alpha 1$ – $\alpha 7$) wirken stabilisierend und kontrollieren den Zugang zu den katalytischen Zentren. Bei den beiden inneren β -Ringen ($\beta 1$ – $\beta 7$) sind die Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ katalytisch aktiv mit unterschiedlichen Spaltpräferenzen. Nach Spaltungsart der Substrate wird zwischen *peptidyl-glutamyl peptide hydrolase* (PGPH, $\beta 1$) bzw. *caspase-like, trypsin-like* (T-L, $\beta 2$) sowie *chymotrypsin-like* (CT-L, $\beta 5$) Aktivität unterschieden. Durch die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten erfolgt der Abbau in Oligopeptide (nach Kisselev und Goldberg (2001) [134], Hershko und Ciechanover (1992) [136], Schema freundlicherweise von der Firma AdipoGen Life Sciences (CH) genehmigt, modifiziert).

wird zwischen natürlichen und synthetischen Proteasominhibitoren unterschieden [134, 139]. Den natürlichen Proteasominhibitoren sind Lactacystin (isoliert aus *Streptomyces lactacystinaeus*) [140], Epoxomicin (isoliert aus *Actinomycetes*) [141] sowie TMC-95 A, B, C und D (isoliert aus *Apiospora montagnei Sacc.*) zugehörig [142].

Bortezomib (Velcade[®], PS-341, PSI), ein synthetischer und selektiver Proteasominhibitor, zählt zu den Peptid-Boronaten. Das Dipeptidyl-Borsäure-Derivat zeigt eine Inhibition der Proteasomaktivität im niedrigen Bereich (K_i : 0,6 nM) und eine durchschnittliche *growth inhibition 50 %* (GI_{50}) bereits bei einer Konzentration von 7 nM [143]. Peptid-Boronate dissoziieren nur sehr langsam von der proteolytisch aktiven Untereinheit, so dass eine stabile, aber reversible Proteasomhemmung vorliegt [134, 144]. Bortezomib inhibiert z. B. bei der humanen Multiplen Myelomzelllinie U266 reversibel und komplett die *chymotrypsin-like* (CT-L, $\beta 5$) und die *peptidyl-glutamyl peptide hydrolase* (PGPH, $\beta 1$), auch *caspase-like* genannt, katalytische Aktivität des 20S-Proteasoms des konstitutiven Proteasoms sowie des Immunproteasoms [145].

MG132, ebenfalls ein synthetischer und selektiver Proteasominhibitor, ist der Gruppe der Peptid-

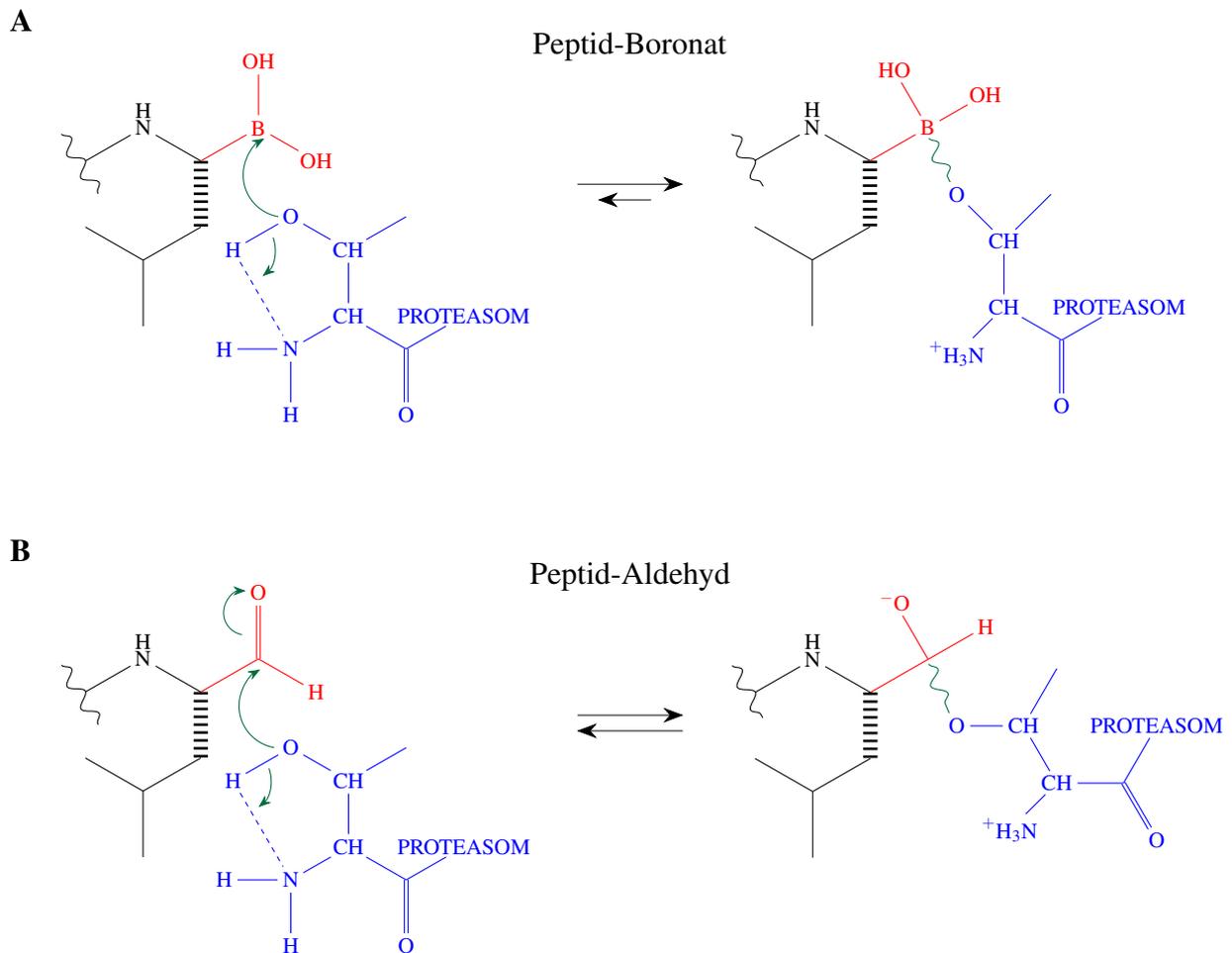


Abb. 2.4 Mechanismen der Proteasominhibition unterschiedlicher Peptid-abgeleiteter Klassen

Schematische Darstellung in **A** der kovalenten Bindung des Boratoms des Peptid-Boronats sowie in **B** der funktionellen Aldehydgruppe des Peptid-Aldehyds mit dem Sauerstoffatom des N-terminalen Threoninrests der proteolytisch aktiven β -Untereinheit des 20S-Proteasoms mit Bildung eines Hemiacetals. Der Peptidanteil des Inhibitors ist spezifisch mit der Substratbindungstasche der aktiven Untereinheit assoziiert. Durch diesen Mechanismus wird die Degradation von Proteinen verhindert. Schwarz: Inhibitor, Rot: Pharmakophor, Cyan: Proteasom, Grün: neugebildete Formation (nach Borissenko und Groll (2007) [138], Schema modifiziert nach Kisselev und Goldberg (2001) [134]).

Aldehyde zugeordnet. Dieser hemmt reversibel und schwächer als Bortezomib bei der Multiplen Myelomzelllinie die CT-L sowie PGPH Aktivität und inhibiert die *trypsin-like* (T-L, β 2i) Aktivität des Immunproteasoms, aber nicht die des konstitutiven Proteasoms [145]. Zusätzlich werden durch MG132 die Proteasen Cathepsin B und Calpain 1 gehemmt [134, 145].

In-vitro- und *In-vivo*-Untersuchungen an Tumormodellen konnten zeigen, dass das therapeutische Potential der Peptid-Boronate vornehmlich auf deren Eigenschaft Apoptose zu induzieren zurückzuführen ist [137], wobei die genauen Mechanismen bisher noch nicht vollständig geklärt sind. So können intrazelluläre Akkumulationen regulatorischer Proteine, insbesondere in maligne transformierten Zellen, vermutlich zu einer Blockierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) führen. Durch extrazelluläre Stimuli, wie z. B. Lipopolysaccharide oder TNF- α [146], aktiviert, reguliert NF- κ B nicht nur Immun- und

Inflamationsreaktionen, sondern spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Tumorgenese durch Suppression der Apoptose sowie Induktion der Zellproliferation und der Angiogenese. Die Stabilisierung seines Inhibitors, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha* ($I_{\kappa}B_{\alpha}$), wirkt hemmend auf dessen Translokation in den Zellkern und somit der nachgeschalteten Signalwege [147]. Weiterhin kann durch die Stabilisierung der *cyclin-dependent kinase* (CDK)-Inhibitoren p21 und p27, des Tumorsuppressors p53, sowie der proapoptischen Proteine *BH3 interacting domain death agonist* (Bid) und *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein* (Bax) das Fortschreiten des Zellzyklus gehemmt und/oder die Zellapoptose gefördert werden [134, 147, 148]. Studien konnten außerdem darlegen, dass auf einem erhöhten Level fehlgefalteter Proteine die *c-Jun-NH₂ terminal kinase* (JNK) mit einer Induktion der Apoptose reagiert [148].

3 Fragestellung

Bisherige Studien weisen bezüglich der Assoziation zwischen dem Humanen Cytomegalievirus (HCMV) und dem kolorektalen Karzinom (KRK) konträre Ergebnisse auf. Die molekularen Mechanismen sind im Hinblick eines möglichen Zusammenhanges derzeit noch nicht vollständig geklärt [123, 124, 129, 130].

Hinsichtlich des Einflusses von Proteasominhibitoren auf HCMV konnten Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass MG132 die virale Replikation von HCMV bei den Fibroblasten inhibiert mit Hemmung der Bildung von infektiösen sowie nichtinfektiösen viralen Partikeln [149].

Um den Einfluss von HCMV und des spezifischen Proteasominhibitors Bortezomib, separat sowie in Kombination, bei dem Kolonkarzinom-Zellmodell Caco-2 zu charakterisieren, sollen folgende Frage beantwortet werden:

1. Ist die Permissivität von Caco-2 für das Ganciclovir (GCV)-resistente klinische HCMV-Isolat möglich?

Diesbezüglich sollen zunächst die Infektionsraten über den Nachweis der Expressionsraten sehr früher (IE1/IE2) viraler Proteine sowie des frühen (pUL44) und des späten (pp28) viralen Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz (IE1, pUL44, pp28) qualitativ analysiert sowie im Anschluss durchflusszytometrisch (IE1/IE2, pp28) quantitativ verifiziert werden.

2. Inhibiert Bortezomib die virale Replikation von HCMV bei den Caco-2?

Zur Beantwortung dieser Frage soll die antivirale Aktivität von Bortezomib sowie (S)-MG132, mitgeführt als Kontrollagens, anhand des Plaquereduktionsassays und der Bestimmung des Selektivitätsindex charakterisiert werden.

3. Welchen Einfluss haben HCMV und/oder Bortezomib auf die Vitalität der Caco-2?

Die Aufklärung dieser Fragestellung soll durch vergleichende Experimente zur Überprüfung des Apoptose/Nekrose-Verhaltens von Caco-2 bei verschiedenen Expositionszeiten von HCMV und/oder Bortezomib erfolgen.

4. Erleichtert die Ko-Kultur und Ko-Infektion der Caco-2 mit nichtinfizierten sowie HCMV-infizierten primären Fibroblasten die HCMV-Infektion der Caco-2 und werden durch die Ko-Kultur die zuvor bei den Mono-Kulturen für HCMV und/oder Bortezomib analysierten Effekte beeinflusst?

Mit der Ko-Infektion soll eine methodische Grundlage etabliert werden, bei der durch eine permanente HCMV-Infektion mittels Fibroblasten die HCMV-Infektion der Tumorzelllinie Caco-2 erleichtert wird. Durch vergleichende Experimente sollen Effekte von HCMV und/oder Bortezomib auf das Apoptose/Nekrose-Verhalten und die Proliferation der Ko-Kultur untersucht werden.

4 Material

4.1 Zelllinien

4.1.1 Humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Caco-2 (Passage 37–70) (siehe (s.) Abb. 4.1 A, B, C) sind eine humane, epitheliale, hypertetraploide, permanente, adhärent proliferierende Kolonkarzinomzelllinie. Fogh *et al.* etablierten 1974 die Zelllinie aus einem primären, mäßig differenzierten Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen Mannes kaukasoider Herkunft [150]. Unter normalen Zellkulturbedingungen sind die Zellen vor dem Erreichen der Konfluenz in Inseln organisiert (s. Abb. 4.1 A). Periphere Zellen dieser Inseln sind undifferenziert und proliferieren, während zentrale Zellen polarisiert werden und anschließend differenzieren. Nach dem Erreichen der Konfluenz ist der gesamte Zellmonolayer polarisiert [151]. Innerhalb von 20 *days* (d) (nach dem Erreichen der Konfluenz) bilden sich heterogene, polarisierte und differenzierte Bereiche im Monolayer aus, welche nach mehr als 30 d (nach dem Erreichen der Konfluenz) entsprechend homogen werden. Die Differenzierung erfolgt spontan mit Expression morphologischer sowie funktioneller Charakteristika reifer Enterozyten. Gekennzeichnet ist die enterozytische Differenzierung durch eine Polarisation der Zellschicht unter Bildung von Domen, das Vorhandensein eines apikalen Bürstensaums mit entsprechender Enzymausstattung sowie *tight junctions*, als Verbindung zwischen benachbarten Zellen [152–154]. Die Zelllinie (Passage 20), *Catalogue No.*: 86010202), wurde kommerziell von der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), Salisbury, UK, erworben.

4.1.2 Human embryonic lung fibroblasts

Human embryonic lung fibroblasts (HELFi301) (Passage 10–20) (s. Abb. 4.1 D, E) sind eine humane, diploide, primäre, adhärent proliferierende Fibroblastenzelllinie, welche 1990 aus dem Lungengewebe eines abortierten Fötus isoliert wurde. Die Überlassung der Zelllinie HELFi301 erfolgte freundlicherweise vom ehemaligen Institut für Angewandte Virologie (IAV), Berlin-Niederschöneweide. Die Zelllinie wurde 2014 durch das Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, zertifiziert.

4.1.3 Human foreskin fibroblasts

Human foreskin fibroblasts (HFF) (Passage 12–37) (s. Abb. 4.1 F, G) sind eine humane, diploide, primäre, adhärent proliferierende Fibroblastenzelllinie. Die Zelllinie HFF wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Christian Sinzger, Universitätsklinikum Ulm, Institut für Virologie, Ulm, zur Verfügung gestellt.

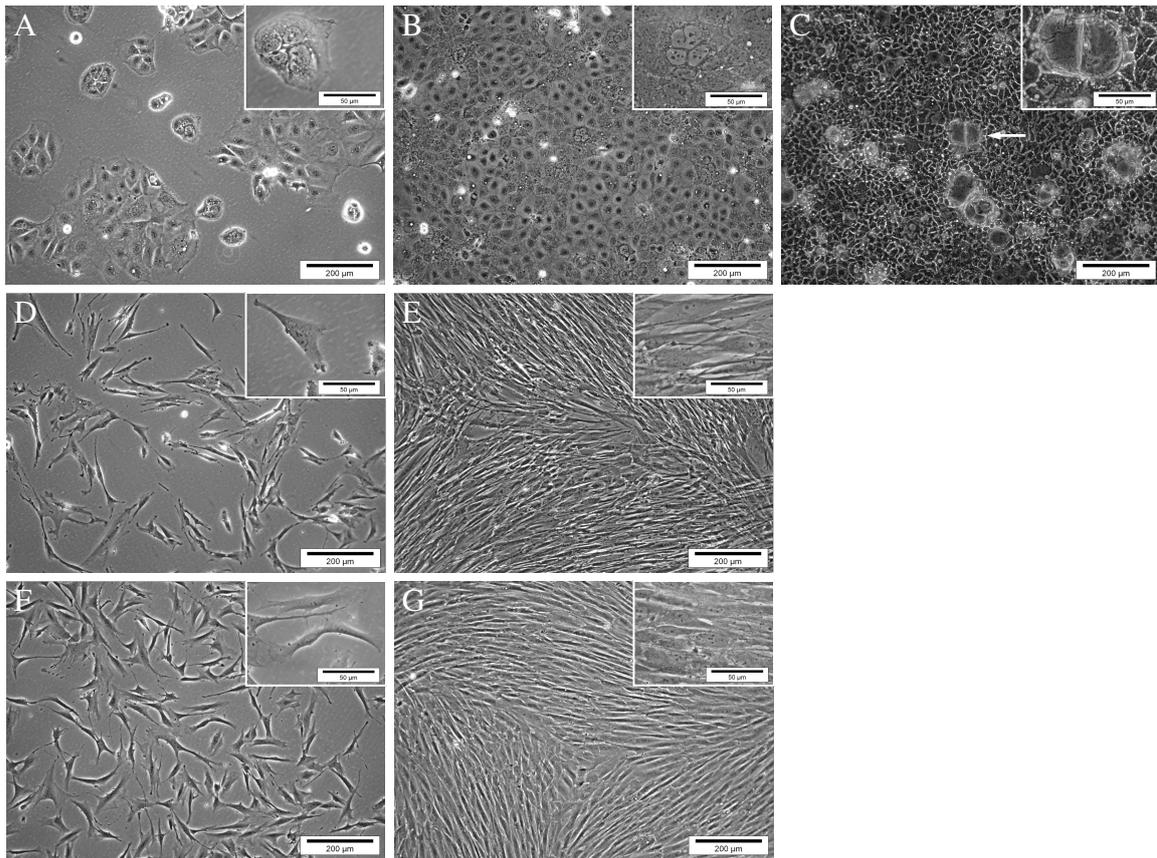


Abb. 4.1 Mikroskopische Darstellung der verwendeten Zelllinien

Mittels Phasenkontrastmikroskopie sind verschiedene Konfluenzgrade der mit 10 % (v/v) *fetal calf serum* (FCS)-*Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) kultivierten Zelllinien Caco-2, HELF Fi301 und HFF repräsentiert. In **A** ist die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, welche zunächst in kleinen Inseln organisiert ist [151], mit geringerer, in **B** mit 100%iger Konfluenz sowie in **C** postkonfluent mit Ausbildung von Dom-Formationen (*hemi-cysts*) (weißer Pfeil), als eines der Differenzierungszeichen [154, 155], dargestellt. **D** zeigt die primäre Fibroblastenzelllinie HELF Fi301 mit geringerer Zelldichte und **E** postkonfluent. In **F** ist die primäre Fibroblastenzelllinie HFF mit geringerer Konfluenz und in **G** postkonfluent ersichtlich. Der Größenstandard entspricht 200 µm im großen Bild und 50 µm im kleinen Bild. Bildanpassung: Helligkeit und Kontrast.

4.2 Virusstamm

Für die Infektionen wurde das Ganciclovir (GCV)-resistente klinische HCMV-Isolat pp6 (Passage 8, 9) verwendet, welches ursprünglich von einem AIDS-Patienten aus Israel stammt und die häufigste UL97-Mutation M460V sowie M460I aufweist. Das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht, Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Tübingen, überlassen.

4.3 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride (TRIS-Salzsäure (HCL))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) Fluoromount-G®	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA
4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton™ X-100)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Aceton	JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Acrylamid, 30 % (w/v) Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Albumin Bovine Fraction V, (bovine serum albumin (BSA))	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bortezomib (PS-341), <i>Catalog No. S1013</i>	Selleck Chemicals, Houston, TX, USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
cOmplete™, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA)-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protease Inhibitor Cocktail	
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> (EMEM)	Lonza, Verviers, BE
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA
Gentamicinsulfat (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Gibco™ MEM NEAA (100X)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GlutaMAX™-I (100X)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HCL, 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lambda-DNA-Standard	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methylcellulose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM) (10x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine</i> (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumazid (Na-azid, NaN ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)-Lösung in Wasser; 7,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 mM)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageRuler™ Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween[®] 20)
(R)-MG132, *Item No.* 13697

(S)-MG132, *Cat. No.* 1748

(S)-MG132, *Lot No.* A00424

Staurosporin

Trypanblau-Lösung, 0,4 %

Trypsin-EDTA (0,25 %) (1X)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cayman Chemical Company, Ann Arbor,
MI, USA

Tocris Bioscience, Bristol, UK

AdipoGen Life Sciences, Liestal, CH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

4.4 Kits

AEC Staining Kit

Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Cell Proliferation Kit II (XTT)

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

BioLegend, San Diego, CA, USA

Cayman Chemical Company,

Ann Arbor, MI, USA

4.5 Antikörper

Die primären und der sekundäre Antikörper wurden für die Durchflusszytometrie (DZ) und die indirekte Immunfluoreszenz (IF) mit PBS/1 % (*w/v*) BSA und für den Western-Blot (WB) mit PBS/0,1 % (*v/v*) Tween[®] 20 verdünnt. Für den Plaquereduktionsassay (PA) erfolgte die Verdünnung des Primärantikörpers mit PBS und die des Sekundärantikörpers mit Blocking-Puffer. Die bei 4 °C gelagerten Primärantikörper wurden mehrmals verwendet und die Sekundärantikörper nach dem erstmaligen Gebrauch verworfen (s. 4.5.1, 4.5.2).

4.5.1 Monoklonale, primäre Antikörper

<i>CMV gB (1-M-12): sc-52400, Mouse mAb</i>	1:50 (DZ)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
<i>CMV pp28 (5C3): sc-56975, Mouse mAb</i>	1:100 (IF) 1:200 (WB) 1:30 (DZ)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
<i>CMV pp52 (CH16): sc-69744, Mouse mAb</i>	1:100 (IF) 1:200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
<i>CMV pp72 (6E1): sc-69834, Mouse mAb</i>	1:100 (IF) 1:200 (WB)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
<i>Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus, Clones CCH2 + DDG9, M0854</i>	1:50 (PA) 1:50 (IF) 1:150 (DZ)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
<i>Mouse anti human Bax (N-terminal), clone: 2D2, MCA2738</i>	1:300 (WB)	BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA

<i>α-Tubulin (DM1A) Mouse mAb, #3873</i>	1:2.000 (WB)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
--	--------------	---

4.5.2 Sekundäre Antikörper

<i>Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), 715-545-150</i>	1:400 (DZ)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
--	------------	---

<i>CyTM 5-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-176-003</i>	1:300 (IF)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
---	------------	---

<i>Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, P 0161</i>	1:500 (PA) 1:5.000 (WB)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
---	----------------------------	--------------------------------

4.6 Proteasominhibitoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteasominhibitoren aus den Klassen der Peptid-Boronate (Bortezomib) und der Peptid-Aldehyde ((S)-MG132, (R)-MG132) eingesetzt (s. Abb. 4.2). (S)-MG132 und (R)-MG132 dienten bei den Experimenten als Kontrollen.

Bortezomib

C₁₉H₂₅BN₄O₄, reversible Hemmung des 20S-Proteasoms

[(1R)-3-methyl-1-[[[(2S)-3-phenyl-2-(pyrazine-2-carboxylamino)propanoyl]amino]butyl]boronic acid

Stammlösung (aliquotiert): 10 mM (100 % (v/v) DMSO), Lagerung: -80 °C

(S)-MG132

C₂₆H₄₁N₃O₅, reversible Hemmung des 20S-Proteasoms

N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal

Stammlösung: 6 mM (95 % (v/v) Ethanol), 10 mM (100 % (v/v) DMSO), Lagerung: -20 °C

(R)-MG132

C₂₆H₄₁N₃O₅, reversible Hemmung des 20S-Proteasoms

N-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-leucyl-N-[(1R)-1-formyl-3-methylbutyl]-L-leucinamide

Stammlösung (aliquotiert): 6 mM (100 % (v/v) DMSO), Lagerung: -20 °C

Die Verdünnung der entsprechenden Stammlösung bis zu den jeweiligen Arbeitskonzentrationen erfolgte in 0 % FCS-EMEM.

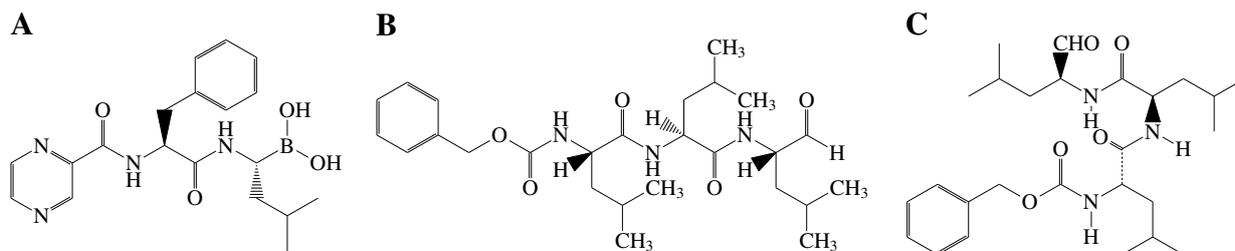


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der verwendeten Proteasominhibitoren

A Bortezomib [156], **B** (S)-MG132 [157], **C** (R)-MG132 [158].

4.7 Medien

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung der Medien bei 4 °C und die der Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur (RT).

4.7.1 Flüssigmedium für die Zellkultivierung

1–10 % (v/v) FCS-EMEM	L-Glutamin (200 mM)	2 mM
	nichtessentielle Aminosäuren (100x)	1x
	Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM
	Gentamicinsulfat (50 mg/ml)	0,05 mg/ml
	FCS	1–10 % (v/v)
	500 ml EMEM	

4.7.2 Halbfestes Methylcellulose-Kulturmedium (Methocel)

L1-Stammlösung	CaCl ₂	0,35 M
	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,2 M
	<i>aqua bidest.</i> , steril filtriert	
L2-Stammlösung	Methylcellulose	0,5 % (w/v)
	L1-Stammlösung	0,5 % (v/v)
	<i>aqua bidest.</i> , autoklaviert	
Methocel	L2-Stammlösung	180 ml
	MEM (10x)	20 ml
	L-Glutamin (200 mM)	2 mM
	Gentamicinsulfat (50 mg/ml)	0,05 mg/ml
	NaHCO ₃ (7,5 %)	0,2 % (v/v)
	FCS	7,5 % (v/v)

4.8 Allgemeine Puffer und Lösungen

<i>aqua bidest.</i>	deionisiertes Wasser (elektrische Leitfähigkeit (23 °C): 0,055 µS/cm) (wenn nicht anders angegeben, wurde das o. g. Wasser verwendet)	
Einfrierlösung	FCS	90 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)
	Lagerung bei 4 °C	

HEPES-Puffer	HEPES	20 mM
	NaCl	150 mM
	ph 7,6	
	<i>aqua bidest.</i>	
	Lagerung bei 4 °C	
PBS (1x)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
	ph 7,4 <i>aqua bidest.</i> , autoklaviert	
PBS (20x)	NaCl	2,74 mM
	KCl	54 mM
	Na ₂ HPO ₄	200 mM
	KH ₂ PO ₄	40 mM
	ph 7,4 <i>aqua bidest.</i> , autoklaviert	
Sammelgel-Puffer (4x)	Tris-HCl, ph 6,8	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
	<i>aqua bidest.</i> Lagerung bei 4 °C	
Trenngel-Puffer (4x)	Tris-HCl, ph 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
	<i>aqua bidest.</i> Lagerung bei 4 °C	

4.9 Verbrauchsmaterialien

CryoPure Gefäß (1,6 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)- und Zellkulturplatten (96-well), lichtundurchlässig	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Glaswaren	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main
Handstückzähler für Zellen	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Magnet-Rührstäbe, -Rührer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1 °C Freezing Containers	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Objektträger (76 x 26 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Parafilm® M	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Pipettenspitzen (0,1 µl, 1 µl, 10 µl, 200 µl, 1 000 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Protran BA85 Nitrocellulose Blotting Membrane (0,45 µm)	GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rotilabo®-Spritzenfilter (Porengröße: 0,22 µm; 0,45 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterican®-Einmal-Injektionskanüle (Ø 0,9 x 70 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Whatman-Filterpapier (WM Whatman 3MM)	GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA
Zählkammer Neubauer improved	LO - Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Zellkulturflaschen (T25 cm ² , T75 cm ² , T175 cm ²)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten (24-well, 12-well, 6-well)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Zellkulturschalen (∅ 35 x 10 mm, ∅ 60 x 15 mm)
Zellschaber

BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Greiner Bio-One International GmbH,
Frickenhausen
SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Zentrifugenröhrchen (∅ 10 x 75 mm)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

4.10 Geräte

BD FACSCalibur™
Bilderzeugung
- CCD (*charge coupled device*)-Kamera Fusion SL

BD, Franklin Lakes, NJ, USA

- ColorView II (CCD-Color-Kamera)
Binder APT.line™ CB 150 (E13)-CO₂ Incubator
Branson Sonifier II W-450
Consort EV243 Electrophoresis power supply
Kleinschüttler KM 2

Vilber Lourmat Deutschland GmbH,
Eberhardzell
Soft Imaging System GmbH, Münster
BINDER GmbH, Tuttlingen
G. HEINEMANN, Schwäbisch Gmünd
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Edmund Bühler GmbH, Tübingen

Mikroskope
- Axio Observer.Z1
- Axiovert 10
- Axio Vert.A1 (Axio Cam ICc 1)
- konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
Eklipse Ti A1/A1R
- Olympus BX60
Mithras LB 940

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Nikon Instruments, Tokio, JP

NanoDrop-ND-1000-UV/Vis-Spectrophotometer
pH-Meter 766 Calimatic

Olympus, Tokio, JP
BERTHOLD TECHNOLOGIES
GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Knick Elektronische Messgeräte
GmbH & Co. KG, Berlin
Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Bibby Scientific Ltd., Stone, UK
Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Hofer, Inc., Holliston, MA, USA

Sterilwerkbank Antair BSK-4 MP
Stuart Shaking Incubator SI500
Sunrise™
TE70XP Semi-Dry Transfer Unit with
Built-In Power Supply
TS-100 Thermo Shaker
Vertikales Elektrophoresesystem
Vortex Genic 2TM
Wasserbad Typ: W350t
Wippschüttler/Taumelgerät
Zentrifugen

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Universitätswerkstatt Erlangen
Bender & Hobein GmbH, Bruchsal
Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Gasser Apparatebau, Teufen, CH

- Eppendorf Centrifuge 5417R
Rotor: Fixed-angle rotor FA- 45-30-11
- Heraeus Labofuge 400 Functionline
Rotor: #8177, #8179
- Hettich Mikro 120
- Micro centrifuge

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

4.11 Software

BD Cellquest™ Pro Version f.8.8f1b
cellD Version 2.8 (Build 1235)

BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Olympus Soft Imaging Solutions GmbH,
Münster

FACSCalibur™ Version 4.9.4f2b
FlowJo™ 10.1r5

Fusion SL 4.2 MP
(CCD (*charge-coupled device*)-Kamera)
Fusion Version 15.18

GIMP 2.8.18
GraphPad Prism® V 7.00
LaTeX

Magellan™ V3.11/3,1,1,1
Microsoft® Office 2010
MikroWin 2000, Version 4.34

NIS-Elements AR 4.30.02
NIS-Elements Viewer Version 4.20

BD, Franklin Lakes, NJ, USA
FlowJo, LLC, Data Analysis Software,
Ashland, OR, USA
Vilber Lourmat Deutschland GmbH,
Eberhardzell
Vilber Lourmat Deutschland GmbH,
Eberhardzell
Open-Source-Software
GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
www.latex-projekt.org
Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Microsoft GmbH, Unterschleißheim
BERTHOLD TECHNOLOGIES
GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Nikon Instruments, Tokio, JP
Nikon Instruments, Tokio, JP

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zelllinien Caco-2, HELF Fi301 und HFF

Die adhärent proliferierenden Caco-2, HELF Fi301 und HFF wurden als Monolayerkulturen in 25 cm²-, 75 cm²- oder 175 cm²-Zellkulturflaschen in 10 % (v/v) FCS-EMEM im Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Inkubator unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre (ECACC) kultiviert. Die Subkultivierungen sowie die Zellernten erfolgten im subkonfluenten Proliferationsstadium bei einer Konfluenz von ca. 80–85 %. Entsprechend der Wachstumsfläche wurden dazu die Zellen nach dem Absaugen des Zellkulturüberstandes, welcher FCS und andere Trypsin-inhibierende Substanzen enthält, einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 1 ml, 3 ml oder 5 ml Trypsin-EDTA (0,25 %), bezüglich der vorgenannten Wachstumsfläche, die Zellablösung im CO₂-Inkubator. Die abgelösten Zellen wurden in 10 % (v/v) FCS-EMEM aufgenommen und nach der Sedimentation (200 x g, 5 min, RT) in Kulturmedium resuspendiert. Für die Experimente erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration pro ml und die Aussaat der Zellen mit definierten Zellzahlen in 10 % (v/v) FCS-EMEM (s. 5.1.3). Für die Subkultivierung wurden die Zellen in dem entsprechenden Kulturmedium in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 2, Caco-2 bis 1 : 10, ausgesät.

5.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden mit definierten Zellzahlen in 1 ml Einfrierlösung aliquotiert und bei -80 °C mittels Isopropanol im *Cryo 1 °C Freezing Container* mit einer gleichmäßigen Abkühlrate von -1 °C/min schonend eingefroren und danach im flüssigen Stickstoff (-196 °C) gelagert. Um dem zytotoxischen Effekt von DMSO entgegenzuwirken, erfolgte für eine erneute Kultivierung der Zellen das Auftauen zügig bei 37 °C. Nach dem einmaligen Waschen mit vorgewärmtem Kulturmedium und der Sedimentation (200 x g, 5 min, RT) wurden die Zellen in 10 % (v/v) FCS-EMEM resuspendiert und ausgesät.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Anhand des Trypanblau-Ausschlusstests besteht die Möglichkeit, vitale von avitalen Zellen zu differenzieren. Infolge erhöhter Membranpermeabilität avitaler Zellen diffundiert der Diazofarbstoff in das Cytosol, wobei dessen Anion unspezifisch an Zellproteine bindet und somit die Zelle blau färbt. Vitale Zellen mit intakter Membran nehmen Trypanblau nicht auf und erscheinen hell leuchtend sowie farblos bei lichtmikroskopischer Betrachtung [159]. Unter Anwendung dieses Verfahrens konnte die Zellkonzentration pro ml der Zellsuspension für die Aussaat definierter Zellzahlen be-

stimmt werden. Zudem wurde ebenso das Proliferationsverhalten der Zellen bei den folgenden Experimenten analysiert (s. Tab. 5.1). Für die Bestimmung der Zellkonzentration pro ml kam die Zählkammer Neubauer improved zur Anwendung. Gleiche Volumina der Zellsuspension und 0,4 % Trypanblau-Lösung wurden dazu gemischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 min bei RT [160] konnten, nach dem Befüllen der Kammer, die vitalen Zellen der vier großen Eckquadrate (EQ), sowie oben und links auf den Linien, mithilfe eines Lichtmikroskops und eines Handstückzählers gezählt werden. Nach Bildung des Mittelwertes (MW) aus den gezählten Zellen diente die folgende allgemeingültige Formel (s. (5.1)) [161] der Berechnung:

$$\text{Zellkonzentration/ml} = \text{Zellzahl}_{MW} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor} (10^4) \quad (5.1)$$

$$\text{Volumenangabe}_{EQ}: \text{Fläche}_{EQ} \times \text{Kammertiefe} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ } \mu\text{l} \text{ oder } 10^{-4} \text{ ml}$$

Um Proliferation und Vitalität der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301 (s. Anhang, Abb. 9.1) für die experimentelle Virusinfektion (s. 5.1.5), nichtinfizierter Caco-2 bei Präsenz von serumarmen Medium vor den Apoptose-Untersuchungen (s. Abb. 6.5) sowie nichtinfizierter und infizierter Caco-2-Mono- und Ko-Kulturen bei Gegenwart von Bortezomib (s. Abb. 6.16) zu prüfen, erfolgte deren Aussaat mit definierten Zellzahlen als Triplet in den entsprechenden Zellkulturplatten (s. Tab. 5.1).

Tab. 5.1 Definierte Zellzahlen für die Untersuchung von Proliferation und Vitalität der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301

Experiment	Zelllinie	Zellzahl	Aussaatformat	FCS-Konzentration
experimentelle Virusinfektion	Caco-2	$2,0 \times 10^4$	24-well-Platte	10 %
	HELF Fi301	$5,0 \times 10^4$	24-well-Platte	10 %
Medium-Behandlung	Caco-2	$2,6 \times 10^5$	6-well-Platte	2 %
Bortezomib-Behandlung	Mono-Kultur			
	Caco-2	$6,0 \times 10^4$	24-well-Platte	2 %
	Ko-Kultur			
	Caco-2	$4,0 \times 10^4$	24-well-Platte	2 %
	HELF Fi301	$2,0 \times 10^4$	24-well-Platte	2 %

Zu den Analysezeitpunkten wurde der Zellkulturüberstand und nach dem Waschen der Zellen PBS in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss an die Zellablösung durch Trypsinierung konnten die Zellen in dem vorgenannten Zellkulturüberstand/PBS-Gemisch resuspendiert und zusammen in das Zentrifugenröhrchen überführt werden. Nach der Sedimentation (200 x g, 3 min, RT) sowie dem Dekantieren des Zellüberstandes erfolgte die Aufnahme des Zellsedimentes in ein zur adäquaten Zellzählung entsprechendes Volumen serumfreien Kulturmediums. Von jeder Probe wurde ein Aliquot zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität entnommen.

Die Zellzahl [$\times 10^n$] der jeweiligen Zellsuspension errechnet sich aus der Zellkonzentration pro ml multipliziert mit dem entsprechenden Volumen [ml]. Die Vitalität [%] wird durch den Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl, vitale und avitale Zellen, einer Zellsuspension bestimmt [161].

5.1.4 Herstellung von Virusstocks und Virustitration

Zur Anzucht [162] des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats und Herstellung von Virusstocks wurden konfluente HFF (ca. 1×10^7) einer 175 cm²-Zellkulturflasche mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 in 30 ml 10 % (v/v) FCS-EMEM infiziert. Die MOI ist definiert als das Verhältnis der Anzahl infektiöser Viruspartikel zu der für die Infektion festgelegten Zellanzahl [163]. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte nachdem etwa 50 % der Zellen einen CPE zeigten. Ungefähr nach 25 d p. i. wurde der Zellkulturüberstand nach der Sedimentation (2.383 x g, 10 min, RT) als zellfreie Virussuspension über einen Spritzenfilter (Porengröße: 0,45 µm) steril filtriert, in 2,0 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, anschließend fraktioniert eingefroren (30 min bei 4 °C, 30 min bei -20 °C) und bei -80 °C gelagert [164].

Für die Quantifizierung infektiöser Einheiten pro ml Virusstocksuspension wurden konfluente HELF Fi301 mit der Zellzahl 4×10^5 pro well einer 12-well-Zellkulturplatte mit 200 µl der entsprechenden Virusstocksuspensionsvolumina, als Duplikate mitgeführt, aus der zuvor in 0 % FCS-EMEM angesetzten logarithmischen Verdünnungsreihe (10^{-1} – 10^{-6}) (Endpunktverdünnungsmethode) infiziert, anschließend mit 2 ml Methocel überschichtet und 7 d inkubiert (s. 5.1.5). Das halb feste Medium verhindert die freie Diffusion der Viren, wodurch nur benachbarte Zellen über Zell-Zell-Kontakte infiziert werden. Die dadurch initiierte Bildung von PFU konnte mittels Plaque-reduktionsassay detektiert werden (s. 5.1.6). Nichtinfizierte Zellen (*mock*) dienten als Kontrolle der Zellproliferation und der Färbung. Der Titer [PFU/ml] errechnet sich aus der gemittelten Anzahl der PFU der beiden Verdünnungsstufen, in denen sie noch lichtmikroskopisch nachweisbar sind, bezogen auf 1 ml Virusstocksuspension.

Korrektur der MOI für die Infektion der Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat

Die aus Vorarbeiten ermittelte MOI von 10 für die Infektion der Caco-2 mit dem HCMV-Laborstamm AD169 wurde auf das in dieser Arbeit etablierte Infektionsschema übertragen. Da die Zellen mit EGTA-Lösung vorbehandelt und während der Infektion sedimentiert werden (s. 5.1.5), musste die Titerbestimmung der Virussuspensionen angeglichen werden. Die erste Infektion der HELF Fi301 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat erfolgte für 1,5 h im CO₂-Inkubator (s. Tab. 5.2, 1. Tabellenspalte), die zweite ohne (s. Tab. 5.2, 2. Tabellenspalte) und die dritte zusätzlich mit 100 µM EGTA-Lösung (EGTA) (s. Tab. 5.2, 3. Tabellenspalte) sowie jeweils mit

Sedimentation entsprechend der experimentellen Infektion der Caco-2 (s. 5.1.5). Der Faktor errechnet sich als Quotient aus dem Titer [PFU/ml] der HELF Fi301 mit 100 μ M EGTA-Lösung und Sedimentation und dem der HELF Fi301 ohne Behandlung. Nach Multiplikation des jeweiligen Faktors mit 10 konnte gemittelt eine MOI von $30,4 \pm 4,8$ bestimmt werden (s. Tab. 5.2).

Tab. 5.2 Bestimmung der MOI für die Infektion von Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat

Titer [PFU/ml]			Faktor x MOI (= 10)
HEL F i301 100 μ M EGTA ⁻ Sedimentation ⁻	HEL F i301 100 μ M EGTA ⁻ Sedimentation ⁺	HEL F i301 100 μ M EGTA ⁺ Sedimentation ⁺	
6,5 x 10 ⁶	11,0 x 10 ⁶	16,0 x 10 ⁶	25
2,1 x 10 ⁶	5,1 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁶	34
1,7 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁶	5,1 x 10 ⁶	30
0,7 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	40
1,8 x 10 ⁶	3,1 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁶	27
1,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	27
1,0 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	30
MW \pm SD			30,4 \pm 4.8

5.1.5 Experimentelle Virusinfektion

In 96-, 24-, 12- oder 6-*well*-Zellkulturplatten erfolgte nach Aussaat definierter Zellzahlen pro *well* (s. 5.1.3) die Infektion von konfluent proliferierten Caco-2 und HELF Fi301 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat, soweit nicht anders angegeben, mit einer MOI von 30 bzw. 1. HELF Fi301 wurden als Referenzzelllinie zur Kontrolle der Methodik mitgeführt. Nach Kultivierung der Caco-2 für 48 h mit 10 % sowie für 24 h mit 1 % (*v/v*) FCS-EMEM, zum Erreichen einer Zellzyklus-Synchronisation [165], wurden die Zellen zunächst für 1 h mit 100 μ M EGTA-Lösung, verdünnt in 0 % FCS-EMEM, inkubiert [151, 166]. Dem anschließenden Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Zellen mit der Virussuspension, entsprechend verdünnt in 0 % FCS-EMEM, für 15 min. Nach der Sedimentation (1 215 x *g*, 45 min, RT) wurden die Caco-2 für weitere 30 min inkubiert. In dieser Zeit finden die Adsorption des Virus und die Zellinfektion statt. Für die Nichtinfektion wurden die Zellen wie vorgenannt mit 0 % FCS-EMEM scheininfiziert (*mock*, nichtinfiziert). Nach dem anschließenden dreimaligen Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Caco-2 mit 2 % (*v/v*) FCS-EMEM sowie mit aufsteigenden Konzentrationen der Proteasominhibitoren entweder in Methocel für 7 d oder in 2 % (*v/v*) FCS-EMEM über definierte Zeiträume. Die Infektion der HELF Fi301, 48 h nach Aussaat, erfolgte nach dem Waschen der Zellen mit PBS für 1,5 h im CO₂-Inkubator. Im Anschluss an dem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen entweder

mit Methocel oder mit 2 % (v/v) FCS-EMEM für 7 d inkubiert. Am 4 d p. i. erfolgte der Zusatz von 2 % FCS pro *well* bei den mit 2 % (v/v) FCS-EMEM inkubierten Zellen beider Zelllinien.

EGTA-Lösung

EGTA 10 mM
 ph 7,64
 20 mM HEPES-Puffer, steril filtriert
 Lagerung bei 4 °C

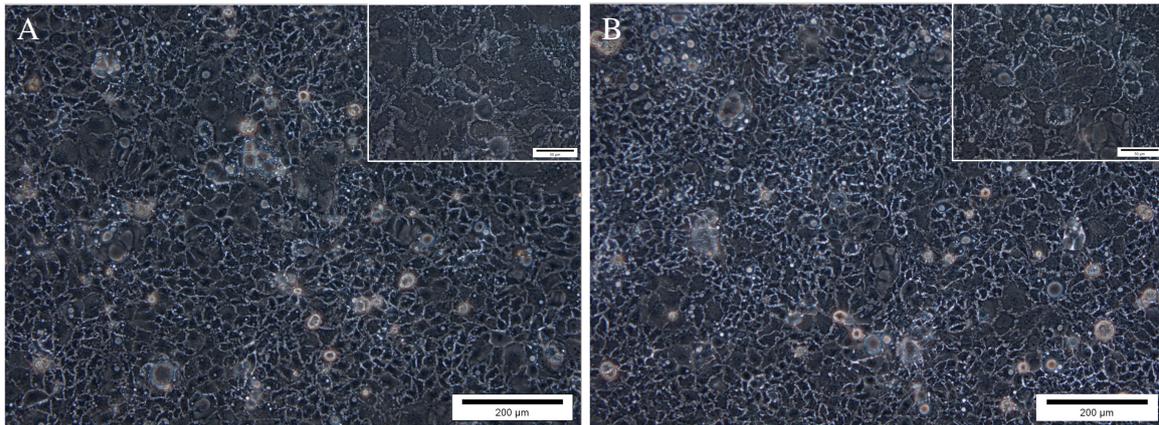


Abb. 5.1 Mikroskopische Darstellung des Effektes von EGTA bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Mittels Phasenkontrastmikroskopie sind synchronisierte Caco-2 nach einstündiger Inkubation in **A** mit 0 % FCS-EMEM sowie in **B** mit 100 µM EGTA-Lösung, verdünnt in 0 % FCS-EMEM, dargestellt. EGTA bewirkt die Trennung der *Zonulae occludentes* (*tight junctions*). Der Größenstandard entspricht 200 µm im großen Bild und 50 µm im kleinen Bild. Keine Bildanpassung.

5.1.6 Plaquereduktionsassay

Anhand des Plaquereduktionsassays kann die Anzahl infektiöser Viruspartikel visualisiert sowie quantifiziert werden. Nach 7 d p. i. erfolgte die Fixierung der Zellen mit dem Ethanol/Aceton-Gemisch [167] für mindestens 20 min bei -20 °C. Anschließend wurden unspezifische Bindungen durch den Blocking-Puffer bei 37 °C für 30 min abgesättigt. Nach Entfernung des Puffers erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper *Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus, Clones CCH2 + DDG9*, gegen die sehr frühen viralen Proteine IE1/IE2. Nach dem fünfmaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP* (s. 4.5) für 2 h inkubiert. Nach dem erneuten fünfmaligen Waschschrift folgte die Kernfärbung mithilfe des *3-Amino-9-ethylcarbazole* (AEC) Staining Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Ungebundene Farbpartikel konnten per einmalige Waschung mit PBS sowie *aqua bidest.* entfernt werden. Durch die Rotfärbung der Kerne ist die Anzahl der *plaque forming units* (PFU) lichtmikroskopisch quantifizierbar.

Blocking-Puffer

PBS (1x)	90 ml
FCS	10 ml
Tween® 20	200 µl
(37 °C)	

Mithilfe des Plaquereduktionsassays sollte für Bortezomib sowie (S)-MG132 der Effekt der Hemmung des Proteasoms auf die Virusreplikation bei den Caco-2 analysiert werden. Die *effective concentration 50 %* (EC₅₀) ist definiert als die Konzentration des Inhibitors, welche 50 % der viralen Replikation vergleichend zu der Kontrolle (100 %) inhibiert. In 24-*well*-Zellkulturplatten wurden zu diesem Zweck $6,5 \times 10^4$ Caco-2 pro *well* ausgesät, infiziert (s. 5.1.5) und mit 1 ml Methocel überschichtet, welches die aufsteigenden Konzentrationen von Bortezomib (1,0 nM; 2,0 nM; 3,0 nM; 4,0 nM; 5,0 nM; 6,0 nM; 7,0 nM; 8,0 nM; 9,0 nM; 10,0 nM), (S)-MG132 (20,0 nM; 40,0 nM; 60,0 nM; 80,0 nM; 100,0 nM; 120,0 nM; 140,0 nM; 160,0 nM; 180,0 nM; 200,0 nM; 220,0 nM; 240,0 nM; 260,0 nM; 280,0 nM; 300,0 nM) sowie (R)-MG132 (0,03 µM; 0,06 µM; 0,09 µM; 0,12 µM; 0,15 µM; 0,18 µM; 0,21 µM; 0,24 µM; 0,27 µM; 0,30 µM; 0,33 µM; 0,36 µM; 0,39 µM; 0,42 µM; 0,45 µM und 0,2 µM; 0,4 µM; 0,6 µM; 0,8 µM; 1,0 µM; 1,2 µM; 1,4 µM; 1,6 µM; 1,8 µM; 2,0 µM; 2,2 µM; 2,4 µM; 2,6 µM; 2,8 µM; 3,0 µM) beinhaltete. Proteasominhibitor-unbehandelte nichtinfizierte sowie infizierte Caco-2 dienten als Kontrollen. Pro Konzentrationsstufe und infizierter Kontrolle wurden drei Parallelansätze angesetzt. Nach 7 d p. i. erfolgte die Durchführung des Plaquereduktionsassays. Bei der Berechnung sind die gemittelten Plaqueanzahlen der Proteasominhibitor-behandelten infizierten Caco-2 prozentual zu denjenigen der entsprechend unbehandelten infizierten Caco-2 (als 100 % definiert) ins Verhältnis gesetzt worden (s. Anhang, Abb. 9.2 A, B). Für (R)-MG132 konnte keine Hemmung der viralen Replikation durch die vorgenannten Konzentrationen detektiert werden (s. Anhang, Abb. 9.2 C, D). Die Tabelle 5.3 zeigt die festgelegten Arbeitskonzentrationen der Proteasominhibitoren für die Experimente. Die für (S)-MG132 ermittelte EC₅₀-Konzentration von 101,33 nM wurde auf 101 nM gerundet (s. Tab. 5.3).

Tab. 5.3 Definierte Arbeitskonzentrationen der Proteasominhibitoren

Proteasominhibitor	Konzentration [nM]			
	EC ₃₅	EC ₅₀	EC ₇₅	EC ₉₀
Bortezomib	2,77 ± 1,12	4,01 ± 0,45	5,51 ± 0,08	6,11 ± 0,11
(S)-MG132		101,33 ± 4,16	157,00 ± 1,00	242,00 ± 3,46

Die EC₃₅, EC₅₀, EC₇₅ und EC₉₀ wurden als die Konzentrationen der Proteasominhibitoren definiert, die zu einer 35%igen, 50%igen, 75%igen und 90%igen Plaquereduktion im Vergleich zu der Proteasominhibitor-unbehandelten Kontrolle führten. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

5.1.7 Zytotoxizitätsbestimmung (XTT-Assay)

Für Bortezomib und (S)-MG132 wurden zum Ausschluss der Hemmung der viralen Replikation durch vorgeschädigte bzw. avitale Wirtszellen die zytotoxische Wirkung auf Caco-2 mittels Cell Proliferation Kit II (XTT) analysiert. Die *cytotoxic concentration 50 %* (CC_{50}) ist definiert als die Konzentration des Inhibitors, welche die Zellebensfähigkeit um 50 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100 %) reduziert. In 96-well-Zellkulturplatten wurden dazu 1×10^4 Caco-2 pro well in 200 μ l 10 % (v/v) FCS-EMEM ausgesät und für 48 h inkubiert. Nach Entfernung der Zellkulturüberstände erfolgte die Inkubation der Zellen mit 100 μ l 2 % (v/v) FCS-EMEM als Kontrolle sowie mit aufsteigenden Konzentrationsstufen von Bortezomib (1,0 nM; 1,1 nM; 1,2 nM; 1,3 nM; 1,4 nM; 1,5 nM; 1,6 nM) und (S)-MG132 (50,0 nM; 60,0 nM; 70,0 nM; 80,0 nM; 90,0 nM; 100,0 nM; 110,0 nM) in 100 μ l 2 % (v/v) FCS-EMEM mit sechs Parallelansätzen. Nach 7 d wurden 50 μ l der *sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate* (XTT)-Reaktionslösung (Gemisch aus XTT und Elektronen-koppelndem Reagenz im Verhältnis von 50 : 1) pro well zugesetzt (Endkonzentration XTT: 0,3 mg/ml) und 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Tetrazoliumsalz XTT wird nur in vitalen Zellen zum wasserlöslichen orangen Formazan-Farbstoff umgesetzt und die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) spektrophotometrisch mittels Mikroplattenleser Sunrise™, Software Magellan™, detektiert. Eine Erhöhung der Anzahl lebender Zellen führt zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen, was direkt mit der Menge des gebildeten Formazans korreliert. Die Absorptionen wurden prozentual zu derjenigen der Kontrolle (als 100 % definiert) ins Verhältnis gesetzt (s. Anhang, Abb. 9.3 A, B).

5.1.8 JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Sehr frühe Stadien der Apoptose äußern sich infolge apoptotischer Stimuli in einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_M$) [168] vermutlich durch die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangs-Pore. Der Ausgleich des Ionengradienten führt zu einer Entkopplung der Atmungskette mit Freisetzung von verschiedenen Procaspasen, Cytochrom c und *apoptosis-inducing factor* (AIF) sowie einer Fülle von weiteren Proteinen aus dem Innenmembranraum in das Cytosol [169]. Für die Detektion der Veränderung des $\Delta\Psi_M$ bzw. des Ausmaßes der Apoptose wurde der lipophile und membranpermeable Carbocyanin-Farbstoff 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1), der eine delokalisierte positive Ladung besitzt, gewählt. Dieser eignet sich zur Bestimmung des elektrochemischen Gradienten. In den Mitochondrien mit einem hohen $\Delta\Psi_M$ kumuliert JC-1 als Aggregatform mit einem Emissionsmaximum bei der Wellenlänge 590 nm im orange-roten Spektralbereich. Mit Abnahme des $\Delta\Psi_M$ liegt der Farbstoff vermehrt

als Monomer im Zytoplasma mit einem Emissionsmaximum bei der Wellenlänge 527 nm im grünen Spektralbereich vor. Die Exzitation erfolgt mit einer Wellenlänge von 490 nm [170, 171].

In lichtgeschützten 96-*well*-Zellkulturplatten kamen $1,5 \times 10^4$ Caco-2 pro *well* in 200 μ l 10 % (v/v) FCS-EMEM zur Aussaat, die wie unter 5.1.5 infiziert wurden. Die Inkubation der entsprechenden Zellen mit 4,01 nM (EC₅₀) und 5,51 nM (EC₇₅) Bortezomib sowie mit 101 nM (EC₅₀) (nur für 7 d) und 157 nM (EC₇₅) (S)-MG132 in 2 % (v/v) FCS-EMEM erfolgte für 7 d, unter Mitnahme der Lösungsmittelkontrollen, sowie für 12 h und 24 h, nach einer Kultivierungszeit von 6,0 d bzw. 6,5 d mit 2 % (v/v) FCS-EMEM. Als Kontrollen dienten nichtinfizierte und HCMV-infizierte Caco-2 (Zellgruppen), kultiviert ausschließlich mit 2 % (v/v) FCS-EMEM. Jeder Ansatz wurde als Duplikat angesetzt. Die Durchführung des Assays erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Die Fluoreszenzen sowie deren Ratio konnten anhand des Mikroplattenleser Mithras LB 940, Software MikroWin 2000, detektiert werden. Für den Vergleich der 12- und 24-stündigen Behandlungszeit der Zellgruppen mit der nichtinfizierten Medium-Kontrolle sowie miteinander wurde die JC-1-Fluoreszenz-Ratio der infizierten gegen die der entsprechenden nichtinfizierten Caco-2 normalisiert [%]. Bei einer apoptotisch hervorgerufenen Depolarisation der Mitochondrienmembran lässt sich das Ausmaß der sehr frühen Apoptose als Verhältnis von J-Monomeren zu J-Aggregaten ausdrücken.

5.1.9 Ko-Kultur und Ko-Infektion

Die Ko-Kultivierung der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit den primären Fibroblastenzelllinien HELF Fi301 oder HFF, zur Beobachtung der Proliferation, erfolgte im Verhältnis von 2 : 1 und 10 : 1 sowie deren Aussaaten im Verhältnis von 2 : 1, jeweils in 10 % (v/v) FCS-EMEM.

Um einen hypothetisch angenommenen positiven Effekt hinsichtlich der Infektion der Caco-2 mithilfe der Ko-Kultur sowie der Ko-Infektion (nichtvorbehandelte Caco-2 und HCMV-infizierte Fibroblasten gemischt) zu zeigen, erfolgte die Infektion der Caco-2-Mono-Kultur (Kontrolle) sowie Ko-Kultur durch eine Virussuspension niedrigen HCMV-Titers (MOI = 30), wie unter 5.1.5 beschrieben. Pro *well* wurden je im Triplet für die nichtinfizierten und infizierten Mono-Kulturen 6×10^4 Caco-2, für die jeweiligen Ko-Kulturen 4×10^4 Caco-2 und 2×10^4 HELF Fi301 (gemischt) sowie entsprechend $1,2 \times 10^5$ HELF Fi301 (Referenzzelllinie) in 24-*well*-Zellkulturplatten ausgesät. Der Kultivierungszeitraum und die Vorbereitungen der Ko-Kulturen für die Infektion entsprachen denjenigen der Mono-Kulturen (s. 5.1.5). Am Tag der Infektion, nach Überschichtung der Mono- und Ko-Kulturen mit Methocel, erfolgte gleichzeitig die Mischung frisch geernteter und nichtsynchronisierter Caco-2 mit den HCMV-infizierten HELF Fi301 (definierte Zellzahlen (s. 5.1.3)) in Methocel. Diesbezüglich wurden zuvor die HELF Fi301 mit einer MOI von 0,1, glei-

cher Virussuspension wie vorgenannt, infiziert. Bei einem CPE von gerade 100 % erfolgten die obigen Zellaussaaten. Nach 7 d p. i. konnten mittels Plaquereduktionsassay die Plaques visualisiert und lichtmikroskopisch quantifiziert werden (s. 5.1.6). Die jeweiligen Plaquesanzahlen wurden prozentual zu derjenigen der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. In dieser Arbeit wurde die Bezeichnung „Gesamt“ in Verbindung mit der Ko-Kultur bei deren Ergebnisbeschreibung verwendet.

5.2 Molekularbiologische Methode

5.2.1 Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA)

Mit dem Ziel, das Ausmaß der Nekrose vergleichend zu analysieren, wurde nach der 12- und 24-stündigen Behandlung nichtinfizierter und infizierter Caco-2 mit serumarmen Medium und den Proteasominhibitoren aus den gewonnenen Zellkulturüberständen (s. 5.4.2), jeweils als Duplikat angesetzt, freie dsDNA mittels PicoGreen[®]-Reagenz bestimmt. Dies interkaliert vorzugsweise in dsDNA mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor > 1 000 [172, 173]. In Anlehnung an Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen[™]) erfolgte die Quantifizierung von dsDNA. Zur Konzentrationsbestimmung von dsDNA des Lambda-DNA-Standards wurden die Absorptionen (A) bei den Wellenlängen 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) gegen den Leerwert (*aqua bidest.*) am NanoDrop-ND-1000-UV/Vis-Spectrophotometer gemessen. Für die Konzentrationen von wässrigen Nukleinsäurelösungen gilt der Zusammenhang, dass eine optische Dichte (OD)₂₆₀ von 1 einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gilt als Maß für den Reinheitsgrad einer DNA-Lösung oder -Präparation und sollte bei 1,8 liegen [174, 175]. Der Ansatz der Standardkurven sowie die Probenvorbereitungen entsprachen den Herstellerangaben des oben erwähnten Kit. Die Endverdünnung des PicoGreen[®]-Reagenzes betrug 1 : 1 000. Die Fluoreszenzen der DNA-Standardkurven sowie der Zellkulturüberstände pro lichtgeschützter 96-well-ELISA-Platte wurden am Mithras LB 940, Software MikroWin 2000, detektiert. Die Exzitation erfolgte mit Licht der Wellenlänge 485 nm, die Messung der Emission der Fluoreszenzen bei der Wellenlänge 535 nm. Ausgehend von der *low-range*-DNA-Standardkurve (blank; 25 pg/ml; 250 pg/ml; 2,5 ng/ml; 25 ng/ml), mittels Software GraphPad Prism[®] interpoliert, konnten die Konzentrationen von dsDNA [ng/ml], Leerwert-korrigiert, der infizierten gegen die der entsprechenden nichtinfizierten Caco-2 normalisiert [%] werden. Dadurch wird ein Vergleich der 12- und 24-stündigen Behandlungszeit der Zellgruppen mit der nichtinfizierten Medium-Kontrolle sowie miteinander möglich. Insgesamt lagen die Konzentrationen von dsDNA im Bereich von 3,5–5,7 ng/ml.

TE-Puffer	
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
ph 7,5	
<i>aqua bidest.</i>	

5.3 Proteinchemische Methode

5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Nachweis viraler Proteine und des proapoptotischen Proteins Bax wurden die Proteinlysate mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) aufgetrennt und im Western-Blot (Immunoblot) immunologisch detektiert. Bei der eindimensionalen SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung denaturierter Proteine im elektrischen Feld in einem Polyacrylamid-Gel [176] nach ihrem Molekulargewicht. Durch die Bindung des negativ geladenen Detergens SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Das Bindungsverhältnis impliziert eine konstante negative Ladung der Proteine zur Masse, die eine Auftrennung ausschließlich nach dem Molekulargewicht der linearisierten Proteine erlaubt [177].

In dieser Arbeit kam die diskontinuierliche SDS-PAGE zur Anwendung mit dem Vorteil einer hohen Bandenschärfe gegenüber dem kontinuierlichen System. Hierbei werden zwei verschiedene Gele benutzt, die sich hinsichtlich ihres pH-Wertes, ihrer Ionenstärke und Porengröße unterscheiden. Im Sammelgel (pH 6,8) erfolgt die Konzentrierung der aufzutrennenden Proteinlysate, die anschließend im Trenngel (pH 8,8) aufgetrennt werden [177]. Für den Nachweis der entsprechenden Zielproteine kamen $2,6 \times 10^5$ Zellen der Ko-Kultur (s. 5.1.9) und 5×10^5 HELF Fi301 pro well in 4 ml 10 % (v/v) FCS-EMEM in 6-well-Zellkulturplatten zur Aussaat. Nach der Infektion (s. 5.1.5) wurden die Ko-Kulturen mit 2,77 nM (EC₃₅) und 4,01 nM (EC₅₀) Bortezomib sowie mit 101 nM (EC₅₀) und 157 nM (EC₇₅) (S)-MG132 in 2 % (v/v) FCS-EMEM unter Mitführung nichtinfizierter Zellen gleicher Behandlung inkubiert. Als Kontrollen dienten nichtinfizierte und infizierte Ko-Kulturen sowie HELF Fi301, kultiviert ausschließlich mit Medium. Nach 7 d p. i. wurden zur Gewinnung der Zellextrakte die Zellkulturen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Sedimentation (1 000 x g, 5 min, 4 °C) der abgeschabten Zellen, welche in 80 µl Protease-Inhibitor-Lösung resuspendiert waren. Nach dem anschließenden mechanischen Zellwand-aufschluss bei 4 °C mittels Ultraschall (3 x 15 s, Leistung 40 %) sowie der folgenden Sedimentation (20 800 x g, 30 min, 4 °C) der Homogenate zur Entfernung der Zelltrümmer wurden die Überstände separiert und gegebenenfalls bei -80 °C gelagert. Das 10%ige Trenngel wird nach Induktion der Polymerisationsreaktion durch 10 % (w/v) APS und TEMED bis auf 1 cm unter dem Kamm gegossen und mit 70 % (v/v) Isopropanol überschichtet nachdem die Glasplatten mittels Abstandshalter

zusammengesetzt waren. Nach der Polymerisation und Entfernung des Isopropanols erfolgte die Überschichtung des Trenngels mit 4%igem Sammelgel und Einsetzen des Kammes. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben (Überstände) mit dem SDS-PAGE-Probenpuffer (6x) gemischt und die Proteine bei 95 °C für 5 min denaturiert. Der mitgeführte Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) diente zur Abschätzung der Molekulargewichte. Die Elektrophorese erfolgte zunächst im Sammelgel bei einer Stromstärke von 10 mA (pro Gel), um eine einheitliche Proteinlauffront zu gewährleisten, und nach dem Einlaufen der Proben in das Trenngel bei einer Stromstärke von 20 mA (pro Gel) in SDS-PAGE-Laufpuffer (1x).

Sammelgel (4 % Acrylamid)

Sammelgel-Puffer	500 µl
30 % (w/v) Acrylamid-Lösung	267 µl
<i>aqua bidest.</i>	1.233 µl
10 % (w/v) APS	20 µl
TEMED	5 µl

SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)

Glycin	1,9 M
Tris	250 mM
SDS	1 % (w/v)
<i>aqua bidest.</i>	

SDS-PAGE-Probenpuffer (6x)

Tris-HCl, pH 6,8	197,4 mM
SDS	6,3 % (w/v)
Glycerin	80 % (v/v)
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	6 % (v/v)
<i>aqua bidest.</i>	

Trenngel (10 % Acrylamid)

Trenngel-Puffer	1.250 µl
30 % (w/v) Acrylamid-Lösung	1.667 µl
<i>aqua bidest.</i>	2.083 µl
10 % (w/v) APS	60 µl
TEMED	10 µl

5.4 Immunchemische Methoden

5.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz ist ein zweistufiges Verfahren, bei dem an das Zielprotein ein Epitop-spezifischer nichtmarkierter Primärantikörper bindet und dieser im Anschluss mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper versetzt wird. Die Bindung von vielen Se-

kundärantikörpern an einem Primärantikörper führt zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals [178].

Unter Nutzung dieser Methode kamen für den qualitativen Nachweis viraler Proteine pro *well* $6,5 \times 10^4$ Caco-2 sowie $1,3 \times 10^5$ HELF Fi301 in 1 ml 10 % (v/v) FCS-EMEM auf Deckgläschen in 24-*well*-Zellkulturplatten zur Aussaat. Die Infektion beider Zelllinien erfolgte wie unter 5.1.5 beschrieben mit anschließender Inkubation in 2 % (v/v) FCS-EMEM für 7 d. Nichtinfizierte und infizierte Caco-2 wurden dabei mit 4,01 nM (EC₅₀) und 5,51 nM (EC₇₅) Bortezomib sowie mit 101 nM (EC₅₀) und 157 nM (EC₇₅) (S)-MG132 inkubiert. Als Kontrollen dienten jeweils Proteasominhibitor-unbehandelte nichtinfizierte und infizierte Zellen. Im Anschluss wurden die Deckglas-Kulturen einmal mit PBS gewaschen, 30 min mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung [167, 179] zur Erhaltung der morphologischen Struktur der Zelle bei RT fixiert und erneut einmal mit PBS gewaschen. Nachfolgend inkubierten die Deckglas-Kulturen 10 min bei RT mit 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung zur Blockierung freier Aldehydgruppen des Paraformaldehyds. Die anschließende Permeabilisierung der Zellmembran mittels 0,2 % (v/v) Triton[®] X-100-Lösung [180] für 5 min bei RT gewährleistet die Bindung der Antikörper an intrazelluläre Antigene [167]. Nach dem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckglas-Kulturen mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper 1 h bei RT und lichtgeschützt in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dem erneuten zweimaligen Waschen mit PBS und einmalig mit *aqua bidest.*, zur Entfernung ungebundener Antikörper, erfolgte die Inkubation der Deckglas-Kulturen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper *CyTM5-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)* (s. 4.5) für 45 min bei RT und lichtgeschützt in der feuchten Kammer. Nach dem weiteren zweimaligen Waschen mit PBS und einmalig mit *aqua bidest.* wurden den Deckglas-Kulturen 8 µl DAPI Fluoromount-G[®] zur Anfärbung der Zellkerne und Fixierung auf den Objektträgern zugegeben und nach deren Trocknung mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Die Fluoreszenzen exprimierter viraler Proteine konnten nach der indirekten Immunfluoreszenz durch die Fluoreszenzmikroskopie am Olympus BX60, ColorView II (CCD-Color-Kamera), detektiert und dokumentiert werden. Filtereinstellung: DAPI (*Filter Cube*: U-MWU, *Excitation Filter*: 330–385 nm, *Barrier Filter*: 420 nm), CyTM5 (*Filter Cube*: U-MWIY, *Excitation Filter*: 545–580 nm, *Barrier Filter*: 610 nm). Die Auswertungen und die Überlagerungen folgten mithilfe der Softwares *cell^D* und *GIMP*.

Für die Verifizierung der durchflusszytometrisch detektierten Expression von pp28 infizierter Caco-2 bei 7-tägiger Gegenwart der EC₇₅-Konzentrationen der Proteasominhibitoren kam zur Analyse und Dokumentation der Fluoreszenzen das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Eklipse Ti (A1/A1R) zur Anwendung. Einstellung: Objektiv: Plan Apo VC 60x Oil Dic N2; Kalibration:

0,419 $\mu\text{m}/\text{px}$; Emissionswellenlänge: DAPI: 450 nm, CyTM5: 700 nm. Die Excitation erfolgte mit Laserlicht der Wellenlänge 406,6 nm sowie 638,3 nm. Durch die Softwares NIS-Elements und NIS-Elements Viewer konnten die Auswertungen und die Überlagerungen durchgeführt werden.

0,2 % Triton[®] X-100-Lösung

Triton [®] X-100	0,2 % (v/v)
1x PBS	

4 % Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd	4 % (w/v)
1x PBS	

50 mM Ammoniumchlorid-Lösung

NH ₄ Cl	50 mM
1x PBS	

5.4.2 Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Zur Erfassung apoptotischer Ereignisse wurde der Cell Death Detection ELISA^{Plus} gewählt. Dieser basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Histone bzw. DNA. Anti-Histon-Antikörper binden an die Histon-Komponente der Nukleosomen und nehmen gleichzeitig die Immunkomplexe der Streptavidin-beschichteten Platte über Biotinylierung auf. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Die Zelltodarten Apoptose sowie Nekrose können somit untersucht werden, da bei der Apoptose die DNA-Fragmente intrazellulär verbleiben, während sie bei nekrotischen Zellen in das Kulturmedium abgegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die relative Quantifizierung von Mono- und Oligonukleosomen innerhalb der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten, wobei deren Anreicherung im Zytoplasma apoptotischer Zellen darauf zurückzuführen ist, dass der DNA-Abbau mehrere Stunden vor dem Plasmamembranabbau auftritt. Nukleosomen, Grundelemente des Chromatins, werden durch ein Kernteilchen gebildet, das aus einem Oktamer der Histonkomponenten H2A, H2B, H3 und H4 sowie 146 Basenpaare der DNA, die um sie gewunden sind, besteht. 15 bis 100 Basenpaare der Linker-DNA verbinden benachbarte Nukleosomen und bilden eine kettenähnliche Struktur, die durch ein weiteres Histon H1 stabilisiert ist. Insbesondere während der Apoptose werden Endonukleasen aktiviert, die spezifisch an die leicht zugänglichen Verknüpfungsstellen binden und das Chromatin in multiple Oligo- und Mononukleosomen (Histon-assoziierte DNA-Fragmente) spalten. Im Gegensatz dazu ist die DNA der Nukleosomen mit den Kernhistonen komplexiert und daher vor

der Spaltung durch Endonuklease geschützt [181].

Die Durchführung des ELISA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Pro *well* kamen dazu $6,5 \times 10^4$ Caco-2 in 1 ml 10 % (v/v) FCS-EMEM in 24-*well*-Zellkulturplatten zur Aussaat, die wie unter 5.1.5 infiziert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 7 d, unter Mitnahme der Lösungsmittel-Kontrollen, sowie für 12 h und 24 h, nach einer Kultivierungszeit von 6,0 d und 6,5 d in 2 % (v/v) FCS-EMEM, mit 4,01 nM (EC₅₀) und 5,51 nM (EC₇₅) Bortezomib sowie mit 101 nM (EC₅₀) (nur für 7 d) und 157 nM (EC₇₅) (S)-MG132 in 2 % (v/v) FCS-EMEM. Nichtinfizierte und HCMV-infizierte Caco-2, die nur mit Medium inkubierten, dienten als Kontrollen. Zudem wurden jeweils $1,3 \times 10^5$ HELF Fi301 für 7 d, wie vorgenannt, kultiviert. Da Apoptose-Effekte überprüft werden sollten, kamen die Kulturmedien vor dem Trypsinieren der Zellen zur Lagerung bei -80 °C. Die im ELISA eingesetzte Zellzahl war auf 1×10^5 eingestellt (s. 5.1.3). Jeder Ansatz wurde als Duplikat angesetzt. Die Detektion der Absorptionen erfolgte bei der Wellenlänge 405 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) spektrophotometrisch mittels Mikroplattenleser Sunrise™, Software Magellan™. Nach der Leerwertkorrektur wurden die Absorptionen, die proportional zu den Histon-assoziierten DNA-Fragmenten sind, der entsprechenden infizierten Caco-2 gegen die der jeweiligen nichtinfizierten Zellen normalisiert [%]. Ermöglicht wird dadurch ein Vergleich der 12- und 24-stündigen Behandlungszeit der Zellgruppen mit der nichtinfizierten Medium-Kontrolle sowie miteinander. Der vom Hersteller beschriebenen Berechnung für den Anreicherungsfaktor konnte nicht nachgekommen werden, da in den meisten Fällen die Absorptionen der Behandlungen unterhalb derer der nichtinfizierten Medium-Kontrollen lag.

5.4.3 Western-Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (s. 5.3.1) aus dem Polyacrylamid-Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren kam das Semi-Dry-Blot-Verfahren zur Anwendung [182]. Die im Anschluss durchgeführte Immundetektion ermöglicht die Visualisierung und somit den Nachweis der Zielproteine.

5.4.3.1 Proteintransfer

Kathodenseitig wurde sandwichartig das Polyacrylamid-Trenngel, welches zuvor in dem Transfer-Puffer äquilibrierte, auf die mit Transfer-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran platziert und beidseits passgenau von dem im Transfer-Puffer getränkten dreilagigen Whatman-Filterpapier flankiert. Durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Trenngel gerichtetes elektrisches Feld mit einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Blot-Fläche erfolgte 1,5 h die Übertragung der Proteine auf die Membran.

Transfer-Puffer

Glycin	200 mM
Tris	25 mM
Ethanol (99,5 %)	20 % (v/v)
ph 8,3	
<i>aqua bidest.</i>	

5.4.3.2 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung freier und unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 h bei RT in Magermilchpulver-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen für je 5 min in PBST erfolgte die Inkubation der Membran mit dem spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenktisch. Als Ladekontrolle diente die Inkubation mit dem α -Tubulin Mouse mAB. Nach dem wiederholten Waschschrift wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (s. 4.5) für 1,5 h bei RT schwenkend inkubiert. Die Eliminierung nicht gebundener Sekundärantikörper erfolgte durch den vorgenannten Waschschrift. Die Membran wurde anschließend den Herstellerangaben entsprechend mit dem Chemolumineszenz-Substrat (Peroxidase- und Luminol/Enhancer-Lösung zu gleichen Anteilen gemischt) des Pierce ECL Western Blotting Substrate zum Anfärben der Proteinbanden für 1 min bei RT versetzt. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert *horseradish peroxidase* (HRP) das zyklische Diazylhydrazid Luminol zu dem angeregten Produkt 3-Aminophthalat. Bei dessen Zerfall in den Grundzustand wird Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert, welches mittels CCD-Kamera Fusion SL und Software Fusion detektiert und visualisiert wurde [183].

Um die Membran für weitere Proteindetektionen verwenden zu können, erfolgte zum Entfernen des primären und des sekundären Antikörpers [184] deren Inkubation mit dem Stripping-Puffer für 12 min bei 37 °C auf dem Schüttler (40 *rounds per minute* (rpm)). Anschließend wurde die Membran mit erneutem Stripping-Puffer für 12 min bei RT auf dem Schüttler (40 rpm) inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen für je 5 min in PBST konnte die Membran wiederholt mit Magermilchpulver-Lösung abgesättigt werden. Das Strippen der Membran kam maximal zweimalig zur Anwendung.

Magermilchpulver-Lösung

Magermilchpulver	5 % (w/v)
PBST	
PBST	
Tween [®] 20	0,1 % (v/v)
PBS (1x)	

Stripping-Puffer

Glycin	500 mM
SDS	1 % (w/v)
pH 2,4	
<i>aqua bidest.</i>	

5.5 Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie ist es möglich, verschiedene optische Eigenschaften der Zellen zu quantifizieren. Suspendierte Einzelzellen werden mit fluoreszenzmarkierten Molekülen als feine Tröpfchen in einer Fließkammer durch einen Laserstrahl geführt, bei der ihre relative Größe (Vorwärtsstreulicht – FSC), relative Granularität (Seitwärtsstreulicht – SSC) und ihre spezifische Fluoreszenz (FL1, FL2, FL3, FL4) mittels Detektoren nachgewiesen werden. Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine, Peptide oder DNA sind u. a. somit bestimmbar. Die Auswertung der Daten erfolgt z. B. als Ein-Parameter- (Histogramm) oder als Zwei-Parameter-Darstellung (Dotplot). Die Fluoreszenzintensität der Einzelmessung zur Zellanzahl wird im Histogramm gezeigt. Durch den Dotplot können Subpopulationen identifiziert und charakterisiert werden [185, 186].

Das in dieser Arbeit genutzte Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ (*facs, fluorescence activated cell sorting*) ist mit zwei Lasern (luftgekühlter 15 mW Argon-Laser, 9 mW 635 nm Dioden-Laser), FSC, SSC und drei Fluoreszenzparameter (FL1, FL2, FL3) ausgestattet [185].

Mithilfe dieses Verfahrens sollten einerseits nach HCMV-Infektion der Caco-2 und der Ko-Kultur durch spezifische Primärantikörper sowie Fluoreszenzfarbstoff-markierte spezifische Sekundärantikörper virale Proteine und andererseits Apoptose/Nekrose-Effekte vergleichend quantifiziert werden.

5.5.1 Detektion viraler Proteine

Gemäß dem Protokoll von Wiebusch und Hagemeyer (2014) [187] erfolgte modifiziert die Quantifizierung der sehr frühen viralen Proteine IE1/IE2 sowie des späten viralen Proteins pp28. Dazu inkubierten $2,6 \times 10^5$ Caco-2 sowie 5×10^5 HELF Fi301 pro *well*, infiziert, wie unter 5.1.5 beschrieben, 7 d in 4 ml 2 % (v/v) FCS-EMEM in 6-*well*-Zellkulturplatten unter Mitnahme entsprechender nichtinfizierter Zellen (*mock*) als Kontrollen. Anschließend wurden die trypsinierten Zellen sedimentiert (200 x g, 3 min, RT) und in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Dem folgten zur Fixierung der Zellen die dreimalige tropfenweise Zugabe von 1 ml Ethanol (99,5 %; -20 °C) bei deren Resuspendierung sowie die Inkubation für 20 min bei 4 °C. Nach dem einmaligen Waschen mit eiskaltem PBS und der Inkubation für 5 min bei 4 °C mit 2 ml 1 % (w/v) BSA, verdünnt in PBS, wurden die Zellen nach der Sedimentation (200 x g, 3 min, RT) mit 150 µl des spezifischen Primärantikörpers für

1 h bei RT lichtgeschützt inkubiert sowie regelmäßig zur besseren Antikörperbindung resuspendiert. Dem einmaligen Waschen der Zellen mit 2 ml 1 % (w/v) BSA, verdünnt in PBS, folgte die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper *Alexa Fluor[®] 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)* (s. 4.5) für 1 h bei RT lichtgeschützt. Die Zellen wurden nach dem entsprechenden Waschschrift in 150 µl PBS aufgenommen und am BD FACSCalibur[™], Software BD CellQuest[™], analysiert. Die Emission des Fluorochroms konnte mittels FL-1 bei einer Wellenlänge von 519 nm detektiert werden (s. Tab. 5.4). Die Exzitation erfolgte mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm. Je Probenansatz kamen durchflusszytometrisch 1×10^5 Zellen (als 100 % definiert) zur Analyse. Durch die Software FlowJo[™] erfolgte nach Diskriminierung des Zelldebris die Auswertung als Event und in Prozent. Für die Darstellung der statistischen Daten, prozentual im Balkendiagramm, kam die Software GraphPad Prism[®] zur Anwendung.

Für die durchflusszytometrische Analyse eines inhibitorischen Einflusses der Proteasominhibitoren auf die Replikation von HCMV bei den Caco-2 anhand des Nachweises des späten Tegumentproteins pp28 wurden die Zellen, wie oben bereits erwähnt, ausgesät und infiziert. Anschließend erfolgte deren Behandlung mit 5,51 nM (EC₇₅) Bortezomib sowie 157 nM (EC₇₅) (S)-MG132 und (R)-MG132 für 7 d. Die EC₇₅-Konzentration von (R)-MG132 entsprach derer von (S)-MG132. Die Inkubation der Zellen mit dem entsprechenden Antikörper, Messung, Auswertung der Daten sowie Darstellung der Ergebnisse entsprach dem Vorgenannten.

Für die optimale Präsentation der pp28-Expression wurde der Endpunkt der y-Achse der Graphen statt 100 % entsprechend dem jeweils höchsten Wert festgelegt.

Tab. 5.4 Einstellungen des BD FACSCalibur[™] für die Detektion der viralen Proteine IE1/IE2 und pp28

Detektor	Spannung	Verstärkung	Modus	Filterwellenlänge [nm]
FSC	E-1	5,41	Lin	-
SSC	358	1,00	Lin	-
FL1	474	1,00	Log	530 / 30

FSC (*forward scatter*): Zellgröße, SSC (*sideward scatter*): Zellgranularität, Lin: linear, Log: logarithmisch [185].

5.5.2 Analyse der Apoptose

Entsprechend dem Protokoll des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI erfolgte nach Herstellerangaben die Zellanfärbung für die Identifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen. Annexin V ist ein Mitglied der Annexin-Familie von intrazellulären Proteinen, die an Calcium-abhängiges Phosphatidylserin binden. Frühzeitig im Apoptose-Prozess transloziert Phosphatidylserin infolge des Verlustes der Membranasymmetrie von der Innenseite der Plasmamembran zur Außenseite. Nach Bindung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Annexin V können

somit durchflusszytometrisch apoptotische Zellen identifiziert werden. Bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen bindet Annexin V an der Membraninnenseite, wodurch nicht zwischen apoptotischen sowie spätapoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden kann. Dagegen passiert Propidiumiodid (PI) die perforierte Zellmembran und interkaliert in dsDNA apoptotischer Zellen des letzten Stadiums und nekrotischer Zellen.

Die Aussaat und Infektion der Caco-2-Mono- und Ko-Kulturen (s. 5.1.9) erfolgte wie unter 5.5.1 beschrieben. Vor der Behandlung wurden die Zellen in 2 % (v/v) FCS-EMEM für jeweils 0 d; 5,0 d; 6,0 d; 6,5 d sowie 6,0 d und 20 h kultiviert. Die Inkubationszeiten der nichtinfizierten und infizierten Mono- und Ko-Kulturen mit erneuertem Medium sowie den Proteasominhibitoren und den Lösungsmitteln (Kontrollen), verdünnt in 2 % (v/v) FCS-EMEM, sind der Tabelle 5.5 zu entnehmen. Als proapoptische/nekrotische Kontrolle diente die Inkubation nichtinfizierter

Tab. 5.5 Definierte Behandlungszeiträume von Caco-2-Mono-Kulturen und Ko-Kulturen mit Bortezomib und (S)-MG132 verschiedener Konzentrationen

Zeit	Behandlung		
	Bortezomib [nM]	(S)-MG132 [nM]	Lösungsmittel
7 d	2,77 (EC ₃₅), 4,01 (EC ₅₀)	101 (EC ₅₀), 157 (EC ₇₅)	DMSO, Ethanol
24 h, 48 h	2,77 (EC ₃₅), 4,01 (EC ₅₀), 5,51 (EC ₇₅)	101 (EC ₅₀), 157 (EC ₇₅)	
12 h, 24 h	2,77 (EC ₃₅), 4,01 (EC ₅₀), 5,51 (EC ₇₅), 6,11 (EC ₉₀)	101 (EC ₅₀), 157 (EC ₇₅), 242 (EC ₉₀)	DMSO
4 h	5,51 (EC ₇₅)	157 (EC ₇₅)	
7 d ^a	2,77 (EC ₃₅), 4,01 (EC ₅₀), 5,51 (EC ₇₅)	101 (EC ₅₀), 157 (EC ₇₅)	DMSO

^a Ko-Kultur

Caco-2 mit Staurosporin (0,5 nM für 14 h und 24 h; 1,0 nM für 16 h). Die Tabelle 5.6 zeigt die Einstellung des Durchflusszytometers für die FITC-Annexin V/Propidiumiodid-Zellanalyse. Die Emissionen der Fluorochrome konnten mittels FL-1 und FL-3 bei einer Wellenlänge von 525 nm und 620 nm detektiert werden. Mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm erfolgte die Exzitation. Durchflusszytometrisch kamen je Probenansatz 1×10^5 Zellen (als 100 % definiert) zur Analyse, die durch die Software FlowJoTM als Event und in Prozent, nach Diskriminierung von Dubletten und Zelldebris sowie nach Kompensation, ausgewertet wurden. Die statistischen Daten sind unter Anwendung der Software GraphPad Prism[®] im Balkendiagramm prozentual gezeigt. Definiert sind in dieser Arbeit Annexin V⁺/PI⁻-Zellen als frühapoptotische Zellen, Annexin V⁺/PI⁺- und Annexin V⁻/PI⁺-Zellen als spätapoptotische/nekrotische Zellen sowie Annexin V⁻/PI⁻-Zellen als vitale Zellen. Für den Endpunkt der Y-Achse der Graphen (Annexin V⁺/PI⁻, Annexin V⁺/PI⁺ und Annexin V⁻/PI⁺) diente der jeweils höchste Wert statt 100 %, so dass Unterschiede optimaler

präsentiert werden konnten.

Tab. 5.6 Einstellungen des BD FACSCalibur™ für die Detektion der FITC-Annexin V/Propidiumiodid-Zellanalyse

Detektor	Spannung	Verstärkung	Modus	Filterwellenlänge [nm]
FSC	E1	5,41	Lin	-
SSC	350	1,00	Lin	-
FL1	474	1,00	Log	530 / 30
FL3	350	1,00	Log	650 LP

FSC (*forward scatter*): Zellgröße, SSC (*sideward scatter*): Zellgranularität, Lin: linear, Log: logarithmisch [185].

5.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen, Zytotoxizitäts- und Plaquereduktionsassays, der durchflusszytometrischen Infektions- und Apoptose/Nekrose-Analysen sowie der Apoptose-Assays Cell Death Detection ELISA^{Plus} und JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit bzw. der Konzentrationsbestimmungen von dsDNA wurden als Einzelwert angegeben oder gemittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Überprüfung erfolgte durch den ungepaarten, zweiseitigen t-Test nach *Student*. Für die Berechnung wurden die Softwares GraphPad Prism[®] V 7.00 sowie Microsoft[®] Excel 2010 genutzt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant. In den grafischen Darstellungen wurde die Signifikanz mit *, #, \$ für $p < 0,05$ (signifikant), **, ##, \$\$ für $p < 0,01$ (sehr signifikant), \$\$\$ für $p < 0,001$ (höchst signifikant) und ****, #### für $p < 0,0001$ (höchst signifikant) ausgedrückt.

6 Ergebnisse

6.1 Nachweis der Permissivität der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat

Um zunächst zu klären, ob die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 permissiv für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat ist, erfolgte diesbezüglich der Nachweis der Expression viraler Proteine sowohl qualitativ durch die indirekte Immunfluoreszenz als auch quantitativ mithilfe der Durchflusszytometrie. Bei den Experimenten dienten HELF Fi301 als Referenzzelllinie.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden nichtinfizierte und infizierte Caco-2- sowie HELF Fi301-Deckglas-Kulturen nach 7-tägiger Kultivierung in Gegenwart von 2 % (v/v) FCS-EMEM (serumarmes Medium) fixiert und mit den spezifischen Primärantikörpern gegen die viralen Proteine IE1 (*immediate early*), *processivity factor* pUL44 (*early*) und Tegumentprotein pp28 (*late*) sowie mit dem Fluorochrom Anti-Maus/Cy5 als Sekundärantikörper inkubiert. Durch die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte der Nachweis der Fluoreszenz (s. 5.4.1). In der Abbildung 6.1 A sind die viralen Proteine IE1 (s. Abb. 6.1 A; B, C) als auch pUL44 (s. Abb. 6.1 A; E, F), wie erwartet, im Zellkern der Caco-2 ersichtlich sowie pp28 (s. Abb. 6.1 A; H, I), welches auf das zytoplasmatische Kompartiment in Nachbarschaft zum Zellkern beschränkt ist. Gleiches ist für HELF Fi301 veranschaulicht (s. Abb. 6.1 A; K, L; N, O; Q, R). Die jeweiligen nichtinfizierten Zellen sind im Anhang, Abbildung 9.4, zu ersehen.

Die durchflusszytometrische Quantifizierung viraler Proteine erfolgte bei den Zelllinien nach der oben erwähnten Kultivierungszeit. Im Anschluss inkubierten die fixierten Zellen mit den spezifischen Primärantikörpern gegen IE1/IE2 und pp28 sowie mit dem Fluorochrom Anti-Maus/Alexa Fluor 488 als Sekundärantikörper (s. 5.5.1). Der Nachweis IE1/IE2-positiver Caco-2 diente dem indirekten Vergleich mit dem Ergebnis des Plaquereduktionsassays im Rahmen der EC₅₀-Bestimmung von Proteasomeninhibitoren (s. Anhang, Abb. 9.2). Die Datenanalyse ergab eine signifikante hohe Infektionsrate mittels Expressionsrate von IE1/IE2 bei den infizierten Caco-2 gegenüber derjenigen der nichtinfizierten Zellen (s. Abb. 6.1 B). Zudem ließ sich eine signifikante gering höhere Infektionsrate mittels Expressionsrate von pp28 bei den infizierten Caco-2, jeweils verglichen, nachweisen (s. Abb. 6.1 C). Die infizierten HELF Fi301 zeigten erwartungsgemäß eine hohe Expressionsrate von IE1/IE2, die Expressionsrate von pp28 war hingegen leicht erhöht, im Vergleich zu derjenigen der entsprechenden nichtinfizierten Zellen (s. Abb. 6.1 B, C).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Experimente den Nachweis der Permissivität der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat.

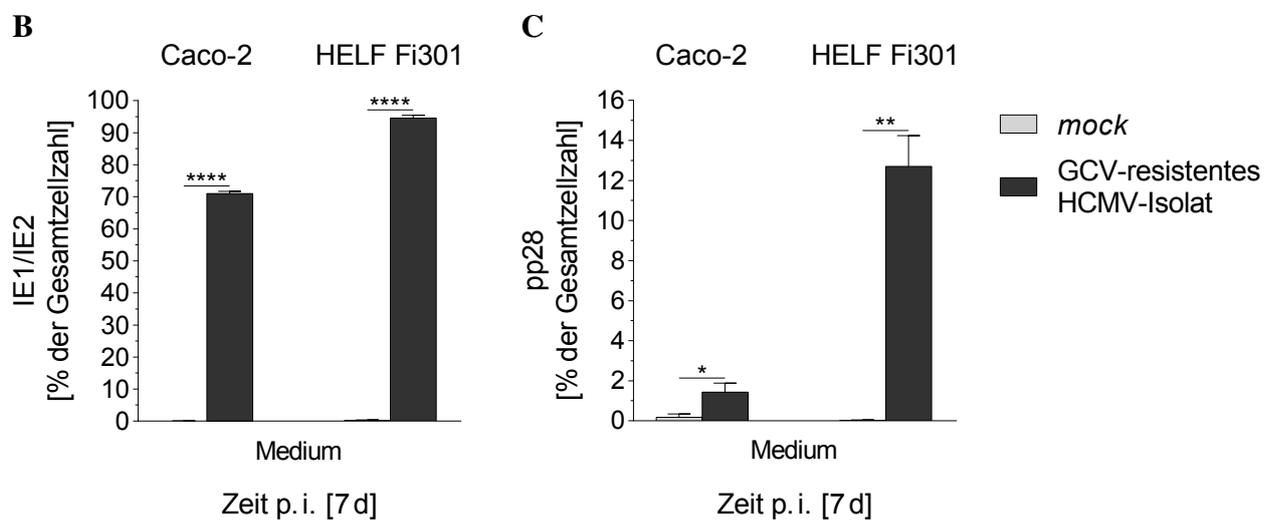
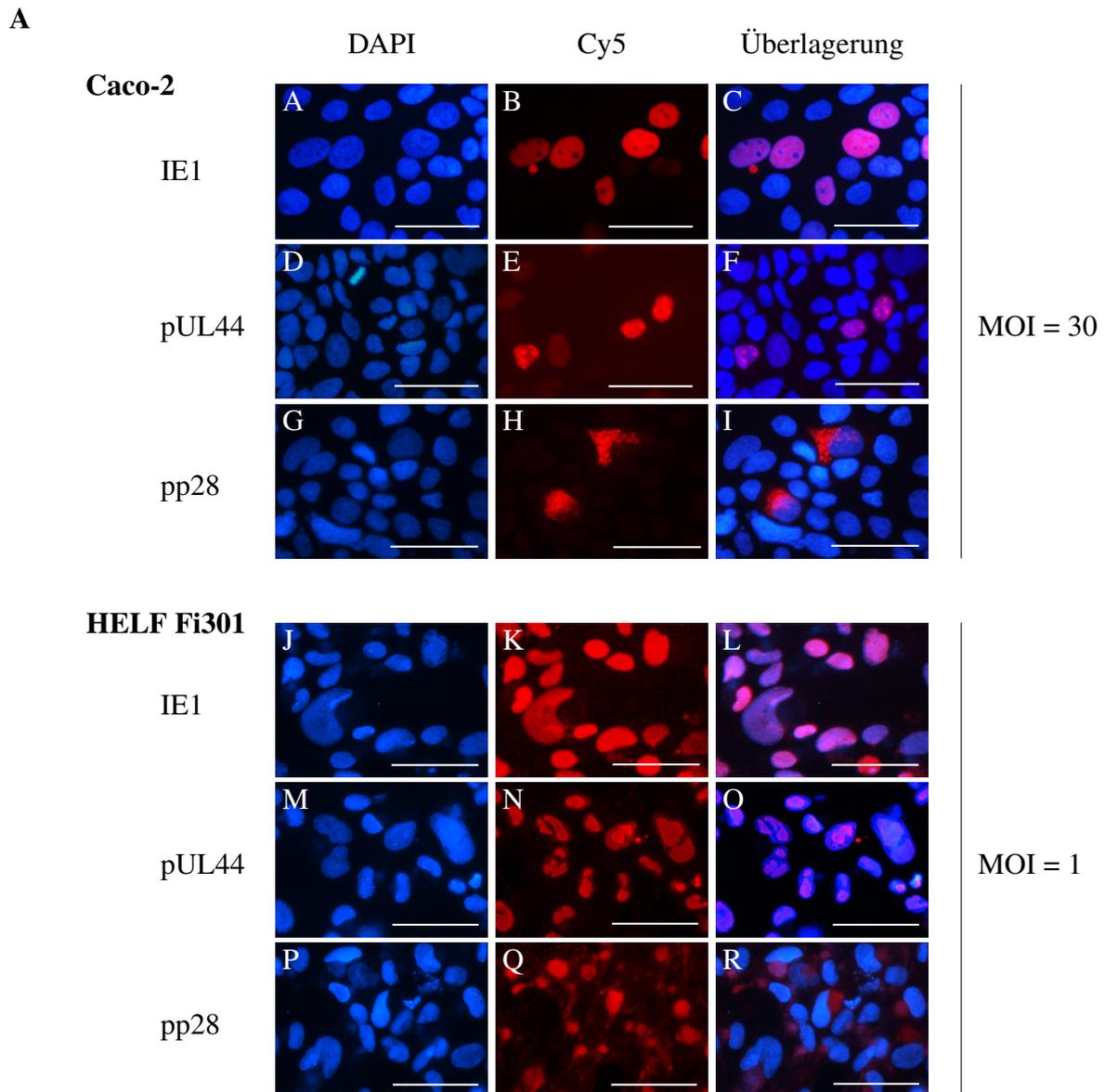


Abb. 6.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis der HCMV-Infektion bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mittels Detektion viraler Proteine

A Nichtinfizierte (*mock*) und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 bzw. 1 infizierte Caco-2- sowie HELF Fi301-Deckglas-Kulturen wurden nach 7-tägiger Kultivierung mit 2 % (*v/v*) FCS-EMEM fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von Primärantikörpern gegen die viralen Proteine IE1, pUL44 sowie pp28. Als Sekundärantikörper diente das Fluorochrom Anti-Maus/Cy5. Durch das DNA-anlagernde Fluorochrom DAPI konnten die Zellkerne gefärbt werden. C, F, I, L, O und R stellen die entsprechenden Überlagerungen der DAPI- und Cy5-Fluoreszenzen nach Fluoreszenzmikroskopie dar. *mock* s. Anhang, Abbildung 9.4. Der Größenstandard entspricht 50 μm . Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind repräsentiert. **B** Nach 7 d p. i. vorgenannter Caco-2 und HELF Fi301 erfolgte die Inkubation der fixierten Zellen mit dem Primärantikörper *Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus, Clones CCH2 + DDG9*, gegen IE1/IE2 sowie mit dem Fluorochrom Anti-Maus/Alexa Fluor 488 als Sekundärantikörper. **C** entspricht B. Als Primärantikörper kam CMV pp28 (5C3) gegen pp28 zur Anwendung. Die viralen Proteine wurden durchflusszytometrisch mithilfe des BD FACSCalibur™ quantifiziert. In B und C repräsentieren die Ergebnisse den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *, **, **** Infektion vs. *mock*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

6.2 Einfluss von Bortezomib auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Um zu überprüfen, ob die Hemmung des Proteasoms durch Bortezomib einen antiviralen Effekt bei den HCMV-infizierten Caco-2 induziert, wurde der Plaquereduktionsassay durchgeführt sowie der Selektivitätsindex (SI), als relatives Maß für die Spanne zwischen zytotoxischer und antiviraler Wirkung, bestimmt [188]. (S)-MG132 fungierte bei den Experimenten als Kontrolle.

Die Ermittlung der 50%igen effektiven Konzentration (EC_{50}) von Proteasominhibitoren erfolgte durch den oben erwähnten Assay. Die Zellen wurden dazu nach 7 d p. i. für eine immunzytochemische Färbung gegen die viralen Proteine IE1/IE2 fixiert. Als Sekundärantikörper kam ein Anti-Maus-IgG/HRP-Konjugat zur Anwendung (s. 5.1.6). Zum Ausschluss der Hemmung der Virusreplikation infolge einer Schädigung der Wirtszelle diente die Bestimmung der 50%igen zytotoxischen Konzentration (CC_{50}) von Proteasominhibitoren mithilfe des XTT-Assays (s. 5.1.7). Die EC_{50} - sowie CC_{50} -Konzentrationen konnten anhand der jeweiligen Einzelkurven grafisch ermittelt werden (s. Anhang, Abb. 9.2, 9.3). Der SI errechnet sich aus der Ratio von CC_{50} zu EC_{50} [188].

Tab. 6.1 Antivirale Aktivität von Proteasominhibitoren gegen das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Proteasominhibitor	EC_{50} [nM] ^a	CC_{50} [nM] ^b	SI ^c
	Plaquereduktion	Zellproliferation	
Bortezomib	4,01 \pm 0,45	1,26 \pm 0,18	0,31
(S)-MG132	101,33 \pm 4,16	98,25 \pm 6,72	0,97

^a Die EC_{50} (50%ige effektive Konzentration) wurde unter Nutzung des Plaquereduktionsassays (AEC Staining Kit) bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

^b Die CC_{50} (50%ige zytotoxische Konzentration) konnte unter Verwendung des Cell Proliferation Kit II (XTT) ermittelt werden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

^c SI (Selektivitätsindex) = CC_{50}/EC_{50} .

Aus der Abbildung 9.2 (A, B) bzw. der Tabelle 6.1 ist ersichtlich, dass Bortezomib sehr stark effektiver (ungefähr 25 Mal) gegenüber (S)-MG132 war, um eine 50%ige Hemmung der Virusreplikation zu erreichen. Zudem wurde für Bortezomib ein Wert für die CC_{50} analysiert, welcher stark vermindert war (um rund $2/3$), verglichen mit dem Wert für die EC_{50} . Für (S)-MG132 konnten annähernd identische Werte für die CC_{50} und EC_{50} ermittelt werden. Bei den Experimenten zur Bestimmung der EC_{50} -Konzentration wurde für Bortezomib beobachtet, dass der Monolayer bei einer Konzentration von 3,0–4,0 nM gering und ab ungefähr 5,0 nM leicht destruiert war mit entsprechend avitalen Zellen im Zellkulturüberstand. Gleiches ergab sich für (S)-MG132 bei den Konzentrationen 120–140 nM sowie 240 nM.

Zusammenfassend konnte aufgrund dieser Ergebnisse vermutet werden, dass der inhibitorische Einfluss von Bortezomib auf die HCMV-Replikation bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 auf zytotoxische Nebeneffekte zurückzuführen war.

6.3 Zeitabhängiger Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 unter Einfluss des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats und/oder Bortezomib

Um genauere Aussagen zum zeitabhängigen Einfluss von HCMV und Bortezomib (separat und in Kombination) auf das Apoptose/Nekrose-Verhalten bei den Caco-2 treffen zu können, wurden folgende Experimente zur Überprüfung durchgeführt. Bei den Untersuchungen diente (S)-MG132 als Kontrolle.

6.3.1 Einfluss von HCMV und/oder Bortezomib bei längerer Gegenwart auf die Apoptose/Nekrose bei den Caco-2

Im Anschluss an die 7-tägige Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib bei den nichtinfizierten und HCMV-infizierten Caco-2 erfolgte anhand der Durchflusszytometrie, des JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit und des Cell Death Detection ELISA^{Plus} die vergleichende Überprüfung von Apoptose/Nekrose-Effekten.

6.3.1.1 Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten mittels Durchflusszytometrie

Bei den unter 6.3.1 erwähnten Caco-2 wurden nach der entsprechenden Behandlungszeit mit serumarmen Medium (Kontrollen), den aufsteigenden EC-Konzentrationen der Proteasominhibitoren sowie den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol (Kontrollen) durchflusszytometrisch Annexin V⁺/PI⁻ (frühaoptotische Zellen), Annexin V⁺/PI⁺ und Annexin V⁻/PI⁺ (spätaoptotische/nekrotische Zellen) sowie Annexin V⁻/PI⁻-Zellen (vitale Zellen) detektiert (s. 5.5.2).

Die Datenanalyse ergab, dass die Lösungsmittel teilweise bei beiden Zellgruppen gering bis

leicht höhere Annexin V⁺/PI⁻-, Annexin V⁺/PI⁺- und Annexin V⁻/PI⁺-Zellraten sowie dementsprechend verminderte Raten Annexin V⁻/PI⁻-Zellen bewirkten, verglichen mit denjenigen der jeweiligen Medium-Kontrolle (s. Abb. 6.2 A, B, C).

HCMV verminderte anscheinend bei den Caco-2, in Gegenwart von serumarmen Medium, gering die Annexin V⁺/PI⁻-Zellrate gegenüber derjenigen der nichtinfizierten Medium-Kontrolle (s. Abb. 6.2 A, links). Verglichen mit der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle, induzierte Bortezomib bei den nichtinfizierten Caco-2 gering verminderte Effekte. Bei den infizierten Zellen führte die höhere EC-Konzentration (4,01 nM (EC₅₀)) zu einem geringfügig höheren Effekt, bei 2,77 nM (EC₃₅) war dieser eher ebenso vermindert. (S)-MG132 zeigte dagegen bei den nichtinfizierten Caco-2 lediglich mit höherer EC-Konzentration (157 nM (EC₇₅)) einen gering verminderten Effekt, bei den infizierten Zellen war kein Unterschied erkennbar (s. Abb. 6.2 A, rechts).

Serumarmes Medium führte bei den nichtinfizierten Zellen zu einer stark höheren Annexin V⁺/PI⁺- und Annexin V⁻/PI⁺-Zellrate im Vergleich zu der Annexin V⁺/PI⁻-Zellrate (s. Abb. 6.2 B, A; links). Für HCMV war kein Unterschied gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle beobachtbar (s. Abb. 6.2 B, links). Bortezomib induzierte mit Konzentrationsanstieg, verglichen mit der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle, bei den nichtinfizierten Caco-2 gering höhere Effekte, bei den infizierten Zellen waren diese minimaler. (S)-MG132 zeigte bei beiden Zellgruppen insbesondere mit der niedrigeren EC-Konzentration (101 nM (EC₅₀)), jeweils vergleichend, gering höhere Effekte (s. Abb. 6.2 B, rechts).

Die Annexin V⁻/PI⁻-Zellraten resultierten aus den zuvor beschriebenen Ergebnissen. Für HCMV ließ sich ein marginaler Unterschied gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle erkennen (s. Abb. 6.2 C, links). Im Vergleich zu der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle induzierte Bortezomib mit der höheren EC-Konzentration bei beiden Zellgruppen leicht verminderte Effekte, (S)-MG132 hingegen mit der niedrigeren EC-Konzentration (s. Abb. 6.2 C, rechts).

Zusammenfassend legten die Untersuchungen nahe, dass die 7-tägige serumarme Medium-Behandlung bei der nichtinfizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 einen wesentlichen prospätaoptotischen/pronekrotischen Effekt induzierte. HCMV wirkte hingegen geringfügig antifrühapoptotisch. Bortezomib zeigte bei den nichtinfizierten Caco-2 einen geringen antifrühapoptotischen sowie gleichermaßen konzentrationsabhängigen prospätaoptotischen/pronekrotischen Effekt. Demgegenüber war bei den infizierten Zellen der Einfluss marginal profrühapoptotisch sowie verminderter prospätaoptotisch/pronekrotisch. (S)-MG132 führte lediglich mit höherer Konzentration bei den nichtinfizierten Caco-2 zu einem geringen antifrühapoptotischen Effekt sowie mit niedrigerer Konzentration bei beiden Zellgruppen zu einem ebenso prospätaoptotischen/pronekrotischen Einfluss.

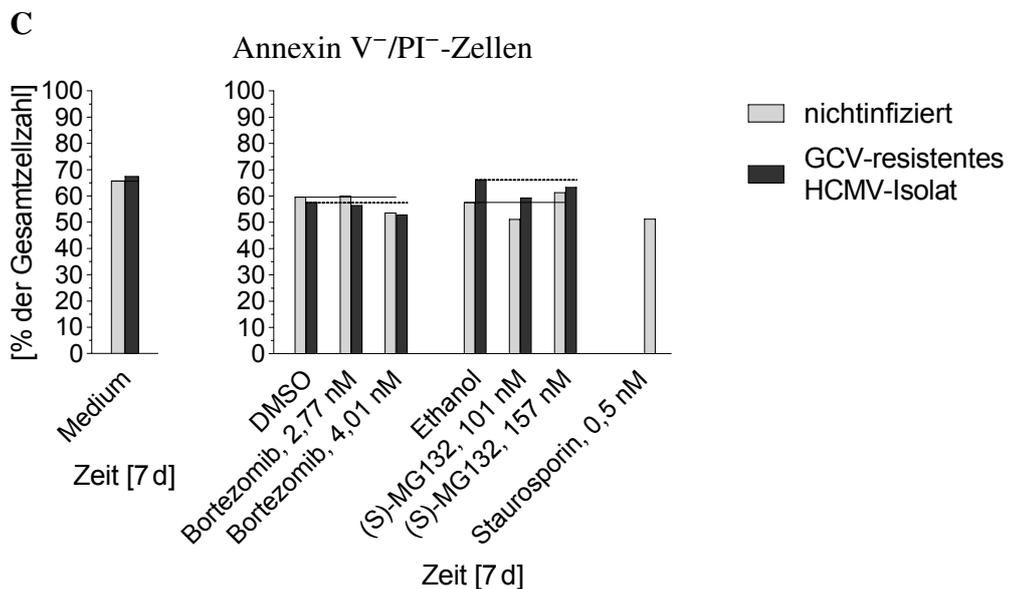
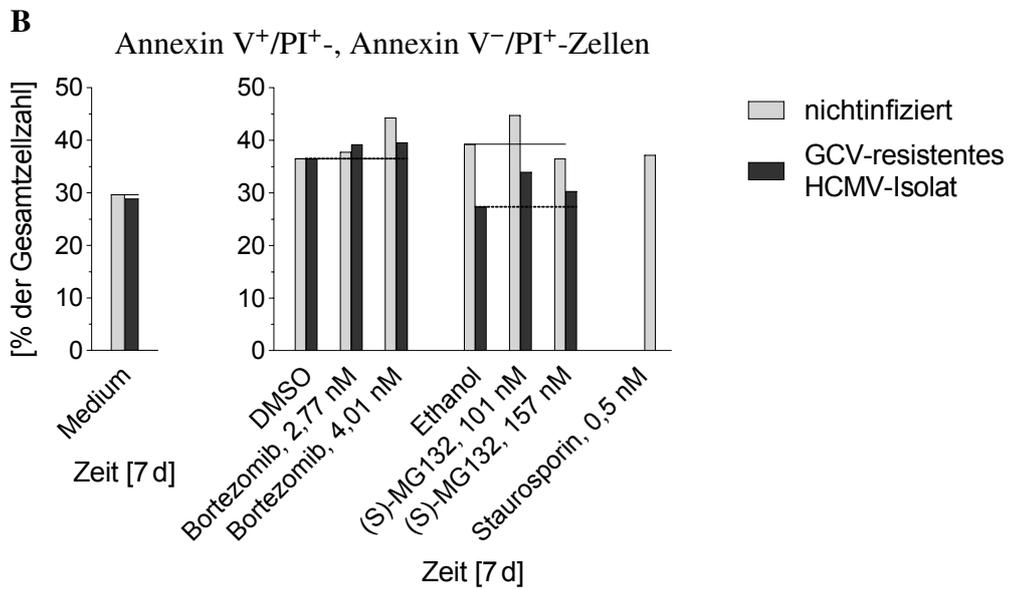
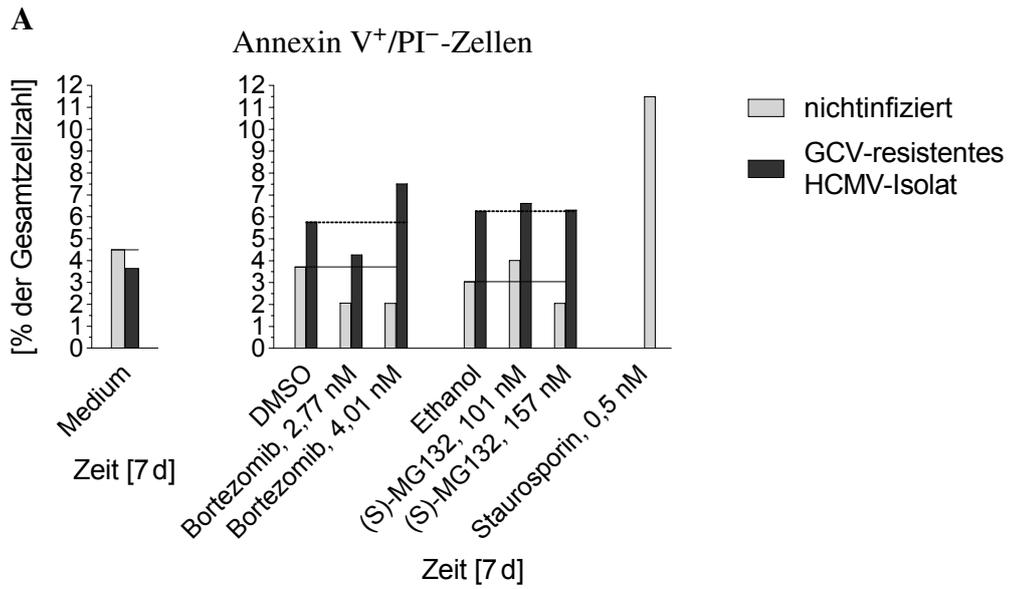


Abb. 6.2 Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Caco-2 wurden nach 7-tägiger Inkubation mit 2% (v/v) FCS-EMEM, Bortezomib (2,77 nM (EC₃₅); 4,01 nM (EC₅₀)), (S)-MG132 (101 nM (EC₅₀), 157 nM (EC₇₅)) sowie den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol unter Nutzung des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI durchflusszytometrisch mittels BD FACSCalibur™ analysiert. Dargestellt sind in **A** Annexin V⁺/PI⁻-, in **B** Annexin V⁺/PI⁺-, Annexin V⁻/PI⁺- und in **C** Annexin V⁻/PI⁻-Zellen [%], links nach Inkubation der Caco-2 mit Medium und rechts mit den Proteasominhibitoren sowie Lösungsmitteln. Die DMSO- bzw. Ethanol-Konzentrationen entsprachen 4,01 nM Bortezomib und 157 nM (S)-MG132. Nichtinfizierte Apoptose/Nekrose-Kontrolle: 0,5 nM Staurosporin für 14 h. In den linken Graphen zeigt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten Medium-Kontrolle. In den rechten Graphen stellt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Lösungsmittel-Kontrolle dar. PI = Propidiumiodid. Die Ergebnisse von einem Experiment sind repräsentiert.

6.3.1.2 Vergleich von Apoptose-Effekten mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Zum Nachweis der Veränderung des $\Delta\Psi_M$, als eines der sehr frühen Ereignisse im Prozess der Zellapoptose, diente der vorgenannte Assay mit Bildung der Ratio von J-Monomeren zu J-Aggregaten nichtinfizierter und infizierter Caco-2 nach 7-tägiger Behandlung mit serumarmen Medium (Kontrollen), den aufsteigenden höheren EC-Konzentrationen gegenüber der Durchflusszytometrie sowie den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol (Kontrollen) (s. 5.1.8).

Aus der Datenauswertung war ersichtlich, dass die Inkubation infizierter Caco-2 mit dem Lösungsmittel DMSO zu einem gering höheren Effekt im Vergleich zu der jeweiligen Medium-Kontrolle führte (s. Abb. 6.3 A, B). HCMV zeigte bei den Caco-2, unter serumarmer Medium-Behandlung, einen mittleren verminderten Effekt gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle

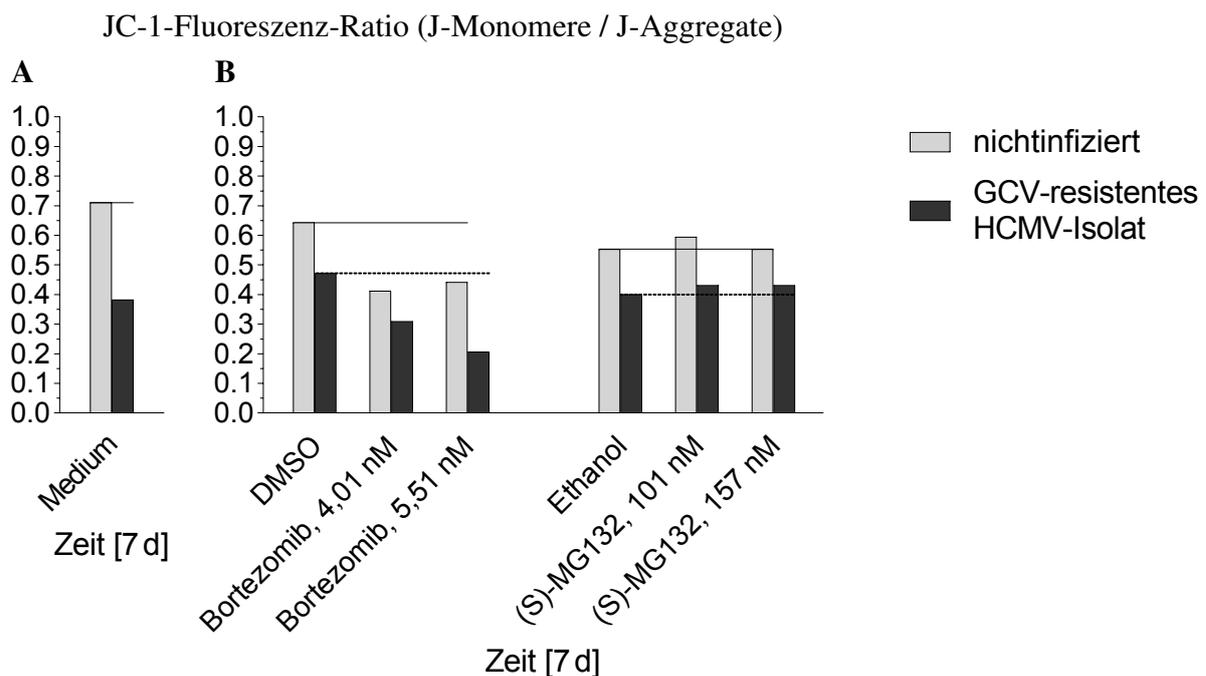


Abb. 6.3 Sehr frühe Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Nach 7-tägiger Inkubation nichtinfizierter und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierter Caco-2 mit 2 % (v/v) FCS-EMEM, Bortezomib (4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅)), (S)-MG132 (101 nM (EC₅₀), 157 nM (EC₇₅)) sowie den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol wurden die Fluoreszenzen und die jeweilige Ratio (J-Monomere / J-Aggregate), grafisch in **A** sowie **B** ersichtlich, nach Durchführung des vorgenannten Assays am Mikroplattenleser Mithras LB 940 detektiert. Die DMSO- bzw. Ethanol-Konzentrationen entsprachen 5,51 nM Bortezomib sowie 157 nM (S)-MG132. In **A** zeigt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten Medium-Kontrolle. In **B** stellt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Lösungsmittel-Kontrolle dar. Die Ergebnisse von einem Experiment sind repräsentiert.

(s. Abb. 6.3 A). Desgleichen lag dieser Trend bei Anwesenheit von Bortezomib konzentrationsunabhängig bei den nichtinfizierten sowie konzentrationsabhängig bei den infizierten Caco-2 im Vergleich zu der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle vor. Für (S)-MG132 ließ sich hingegen jeweils bei beiden Zellgruppen kein Unterschied gegenüber der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle nachweisen (s. Abb. 6.3 B).

Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen vermutet werden, dass HCMV bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, nach 7-tägiger serumarmer Medium-Behandlung, einen mittleren inhibitorischen Effekt auf sehr frühe Ereignisse im Apoptose-Prozess induzierte. Bortezomib zeigte konzentrationsunabhängig bei den nichtinfizierten sowie konzentrationsabhängig bei den infizierten Caco-2 ebensolche antiapoptotischen Effekte. (S)-MG132 war unwirksam.

6.3.1.3 Vergleich von Apoptose-Effekten mittels Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Durch den oben erwähnten ELISA konnten Histon-assoziierte DNA-Fragmente der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten, die das Ausmaß der Apoptose umfassen, bei den wie unter 6.3.1.2 beschriebenen Caco-2 detektiert werden (s. 5.4.2).

Die Auswertung der Daten zeigte, dass das Lösungsmittel DMSO bei den infizierten Caco-2 zu einem marginal höheren Effekt im Vergleich zu der entsprechenden Medium-Kontrolle führte (s. Abb. 6.4 A, B). HCMV induzierte bei den Caco-2, unter serumarmer Medium-Behandlung, einen leicht verminderten Effekt gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle (s. Abb. 6.4 A). Für Bortezomib war dieser Trend bei den nichtinfizierten sowie infizierten Caco-2, im Vergleich zu der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle, ebenso erkenntlich. (S)-MG132 bewirkte bei den nichtinfizierten Caco-2 lediglich mit der niedrigeren EC-Konzentration (101 nM (EC₅₀)) einen gering verminderten Effekt gegenüber der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle. Bei den infizierten Zellen zeigte hingegen die höhere EC-Konzentration (157 nM (EC₇₅)), verglichen mit der infizierten Lösungsmittel-Kontrolle, einen leicht höheren Effekt (s. Abb. 6.4 B).

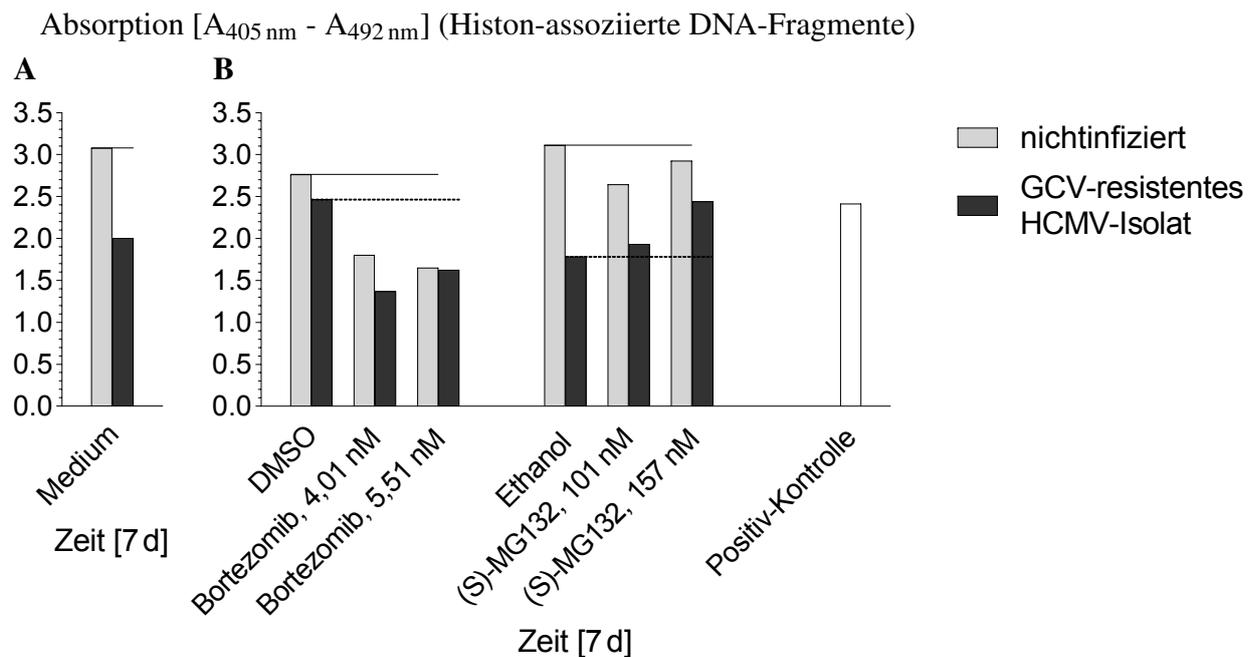


Abb. 6.4 Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Caco-2 wurden mit 2% (*v/v*) FCS-EMEM, Bortezomib (4,01 nM (EC_{50}); 5,51 nM (EC_{75})), (S)-MG132 (101 nM (EC_{50}), 157 nM (EC_{75})) sowie den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol für 7 d inkubiert. Unter Verwendung des vorgenannten ELISA konnten am Mikroplattenleser SunriseTM die Absorptionen, grafisch in **A** und **B** dargestellt, spektrophotometrisch detektiert werden. Diese sind proportional zu den Histon-assoziierten DNA-Fragmenten. Die DMSO- bzw. Ethanol-Konzentrationen entsprachen 5,51 nM Bortezomib sowie 157 nM (S)-MG132. In **A** zeigt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten Medium-Kontrolle. In **B** stellt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Lösungsmittel-Kontrolle dar. Die Positiv-Kontrolle war der Firmen-Positiv-Kontrolle entsprechend. Die Ergebnisse von einem Experiment sind repräsentiert.

Zusammenfassend konnte möglicherweise angenommen werden, dass HCMV einen leichten antiapoptischen Effekt bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2, nach 7-tägiger serumarmer Medium-Behandlung, zeigte. Bortezomib wirkte sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Caco-2 gleichermaßen antiapoptisch. (S)-MG132 führte bei den nichtinfizierten Zellen lediglich mit niedrigerer Konzentration zu einem geringen antiapoptischen Einfluss, bei den infizierten Zellen war dessen Einfluss mit Konzentrationsanstieg leicht proapoptisch.

6.3.2 Einfluss von HCMV und/oder Bortezomib bei kürzerer Gegenwart auf die Apoptose/Nekrose bei den Caco-2

In Bezug zu den Apoptose/Nekrose-Effekten bei 7-tägiger Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib bei den nichtinfizierten und HCMV-infizierten Caco-2 erfolgte nach der 12-, 24- sowie 4-stündigen Zellbehandlung die vergleichende Überprüfung von Apoptose/Nekrose-Effekte mithilfe der Durchflusszytometrie, des JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, des Cell Death Detection ELISA^{Plus} und des PicoGreen[®]-Assays.

6.3.2.1 Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten mittels Durchflusszytometrie

Im Anschluss an die 6,0- und 6,5-tägige Inkubation nichtinfizierter und infizierter Caco-2 mit serumarmen Medium und der erneuten Behandlung mit Medium (Kontrollen) sowie den ansteigenden EC-Konzentrationen der Proteasominhibitoren und deren Lösungsmittel DMSO für 12 h und 24 h erfolgte die durchflusszytometrische Detektion apoptotischer/nekrotischer und vitaler Zellen (s. 5.5.2). Für die Ergebnisinterpretation wurde das Proliferationsverhalten nichtinfizierter Caco-2 durch den Trypanblau-Ausschlusstest nach dem ersten Inkubationszeitraum mit serumarmen Medium untersucht (s. 5.1.3). Bezüglich der Zellzahlen zwischen der 6,0- und 6,5-tägigen Medium-Behandlung konnte beim zweiten Experiment ein größerer Unterschied (um $0,29 \times 10^6$) gegenüber demjenigen (um $0,13 \times 10^6$) des ersten Experimentes analysiert werden (s. Abb. 6.5 A). Beim Vergleich der Vitalitäten lagen keine Unterschiede zwischen den Experimenten vor (s. Abb. 6.5 B).

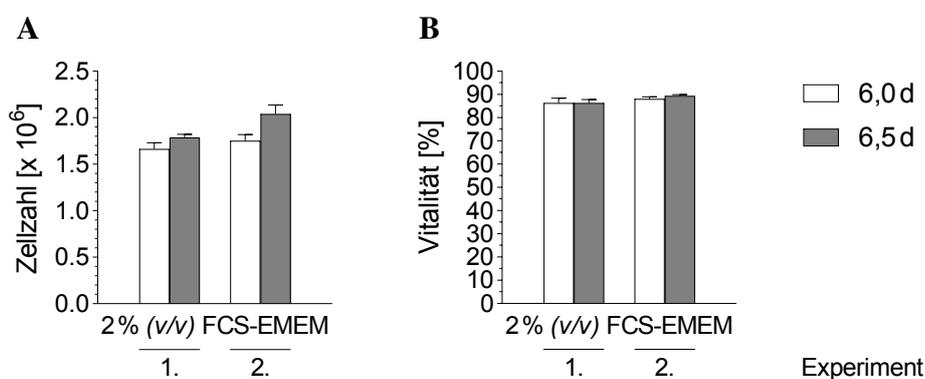


Abb. 6.5 Zeitabhängiges Proliferationsverhalten nichtinfizierter Caco-2

A zeigt die Zellzahl [$\times 10^6$] und **B** die Vitalität [%] nichtinfizierter Caco-2 nach der 6,0- sowie 6,5-tägigen Inkubation mit 2 % (v/v) FCS-EMEM. Durch den Trypanblau-Ausschlusstest erfolgte die Bestimmung vitaler und avitaler Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von einem Experiment aus drei Parallelansätzen. Separat dargestellt sind die Ergebnisse von zwei Experimenten.

Zusammenfassend zeigten die Daten ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der Caco-2 zwischen der 6,0- und 6,5-tägigen Inkubation mit 2 % (v/v) FCS-EMEM bei 100%iger Konfluenz. Zudem war die Zellvitalität lediglich leicht vermindert gegenüber derjenigen, welche bei 5,0-tägiger Gegenwart von 10 % (v/v) FCS-EMEM nachgewiesen werden konnte (s. Anhang, Abb. 9.1 A).

Die durchflusszytometrische Datenanalyse ergab, dass DMSO bezüglich der Annexin V⁺/PI⁺- und Annexin V⁻/PI⁺-Zellrate leicht höhere Effekte nach 12 h bei beiden Zellgruppen, verglichen mit derjenigen der entsprechenden Medium-Kontrolle, induzierte, nach 24 h waren diese lediglich für die niedrigere Konzentration (6,11 nM Bortezomib (EC₉₀)) bei den infizierten Caco-2 erkennbar. Die Höhe der Annexin V⁻/PI⁻-Zellrate verminderte sich dementsprechend. Hinsichtlich der Annexin V⁺/PI⁻-Zellrate zeigte HCMV bei den Caco-2, unter serumarmer Medium-Behandlung, nach 12 h keinen Unterschied gegenüber derjenigen der nichtinfizierten Medium-Kontrolle, nach 24 h war

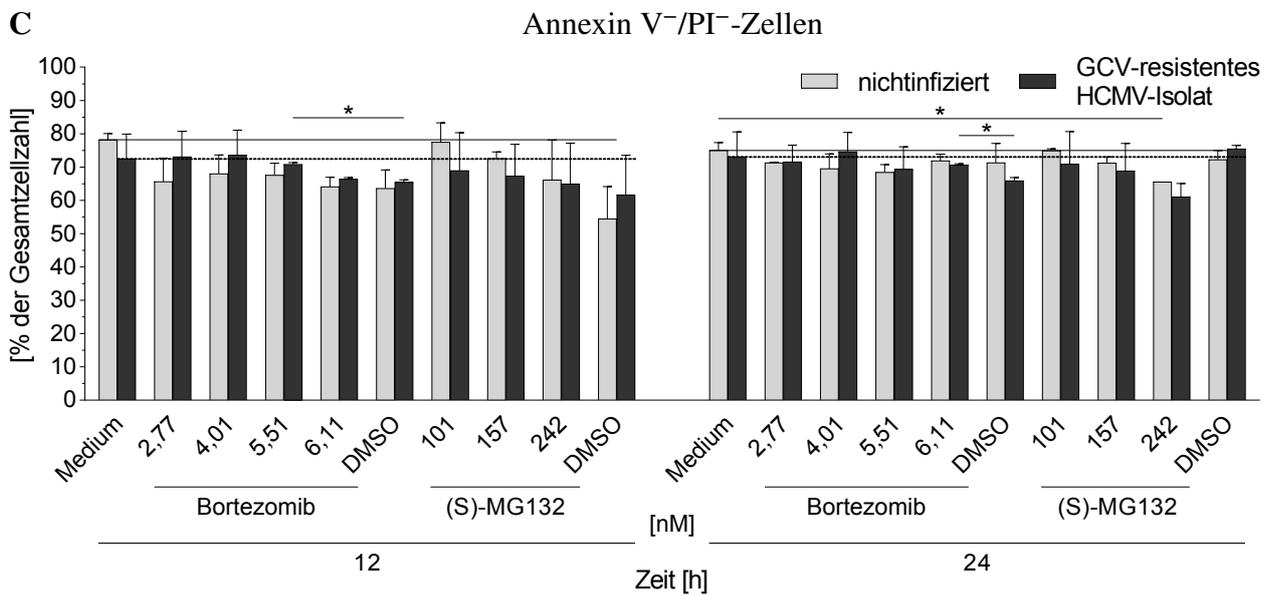
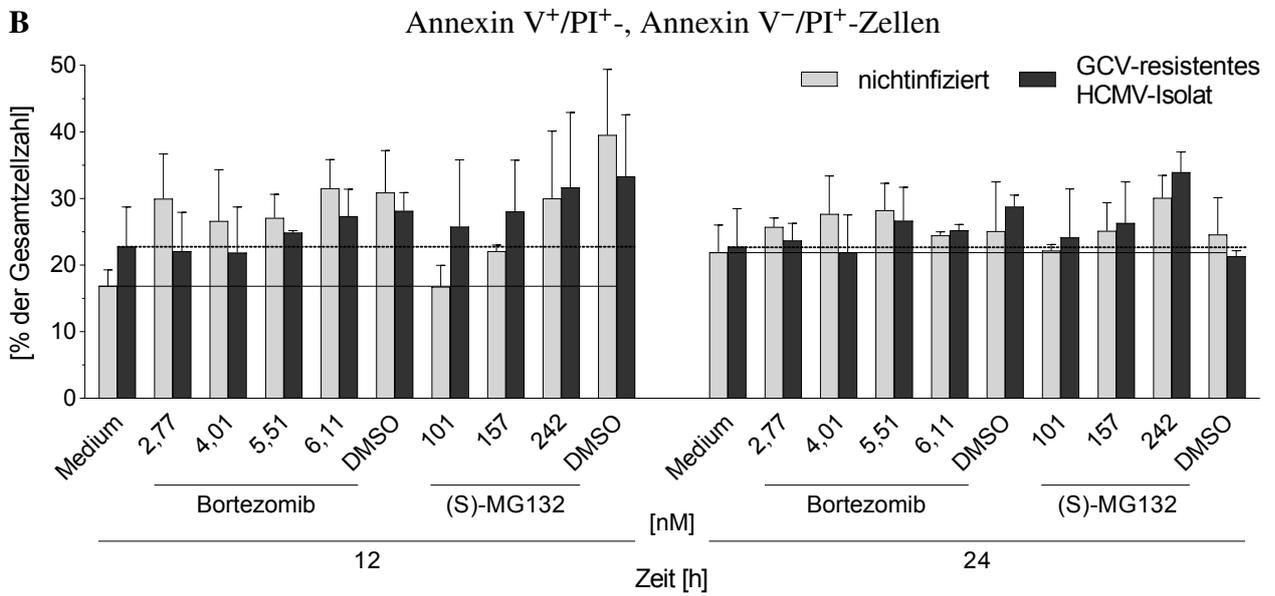
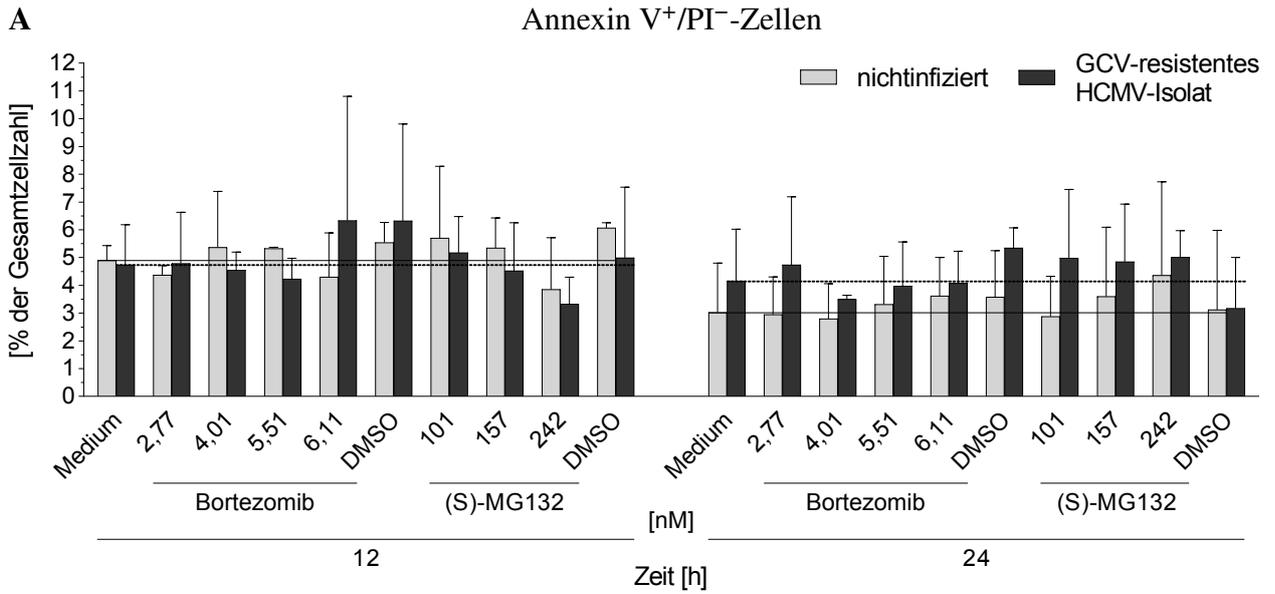
dieser gering. Die Rate war dabei im zeitlichen Verlauf marginal vermindert. Für Bortezomib ließen sich nach 12 h bei beiden Zellgruppen konzentrationsunabhängige geringfügige Unterschiede gegenüber der entsprechenden Medium-Kontrolle nachweisen. (S)-MG132 tendierte jedoch mit Konzentrationsanstieg zu gering verminderten Effekten. Verglichen mit der entsprechenden Medium-Kontrolle war nach 24 h bei den nichtinfizierten Caco-2 ein gegenteiliger Trend erkennbar, für Bortezomib sehr gering. Bei den infizierten Zellen induzierten hingegen beide Inhibitoren konzentrationsunabhängige Effekte, Bortezomib mit den höheren EC-Konzentrationen (5,51 nM (EC₇₅); 6,11 nM (EC₉₀)) (s. Abb. 6.6 A).

Im Vergleich zu der Annexin V⁺/PI⁻-Zellrate führte serumarmes Medium bei den nichtinfizierten Caco-2 nach 12 h zu einer leicht höheren Annexin V⁺/PI⁺- und Annexin V⁻/PI⁺-Zellrate, nach 24 h war dieser Effekt auffälliger (s. Abb. 6.6 A, B). HCMV zeigte zunächst einen geringen Unterschied gegenüber der Kontrolle, welcher nach 24 h nicht mehr erkennbar war. Die Höhe der Rate blieb dabei unverändert. Für Bortezomib lagen bei beiden Zellgruppen nach 12 h konzentrationsabhängige marginale Unterschiede gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrolle vor, für (S)-MG132 war dies stärker. Nach 24 h zeigte Bortezomib konzentrationsunabhängige sehr geringe Unterschiede vergleichend mit der entsprechenden DMSO-Kontrolle, (S)-MG132 jedoch konzentrationsabhängige leicht höhere Effekte gegenüber der jeweiligen Medium-Kontrolle (s. Abb. 6.6 B).

Die obigen Ergebnisse zeigten die Raten Annexin V⁻/PI⁻-Zellen. HCMV führte im zeitlichen Verlauf zu einem geringeren Unterschied im Vergleich zu der nichtinfizierten Medium-Kontrolle. Die Rate vitaler Zellen war dabei sehr gering erhöht. Für die Inhibitoren waren zunächst bei beiden Zellgruppen konzentrationsabhängige, signifikante gering höhere Effekte gegenüber der entsprechenden DMSO-Kontrolle zu verzeichnen. Nach 24 h induzierte Bortezomib ebensolche Effekte, jedoch konzentrationsunabhängig. (S)-MG132 zeigte demgegenüber insgesamt konzentrationsabhängige leicht verminderte Effekte, verglichen mit der jeweiligen Medium-Kontrolle, signifikant mit höchster EC-Konzentration (242 nM (EC₉₀)) bei den nichtinfizierten Caco-2 (s. Abb. 6.6 C).

Die Untersuchungen stellten des Weiteren dar, dass zwischen den infizierten und nichtinfizierten Caco-2 keine signifikanten Unterschiede nachweislich waren (s. Abb. 6.6 A, B, C).

Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen vermutet werden, dass die 24-stündige serumarme Medium-Behandlung gegenüber der 12-stündigen Behandlung bei der nichtinfizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 den leichten prospätaoptotischen/pronekrotischen Effekt gering erhöhte. HCMV, nach 24 h marginal antifrühaoptotisch wirkend, schien den frühaoptotischen Einfluss sowohl von Bortezomib als auch von (S)-MG132 gering zu hemmen. Im Vergleich zur Unwirksamkeit von Bortezomib zeigte (S)-MG132 nach 24 h bei den nichtinfizierten wie bei den infizierten Caco-2 einen konzentrationsabhängigen leichten prospätaoptotischen/pronekrotischen Einfluss.



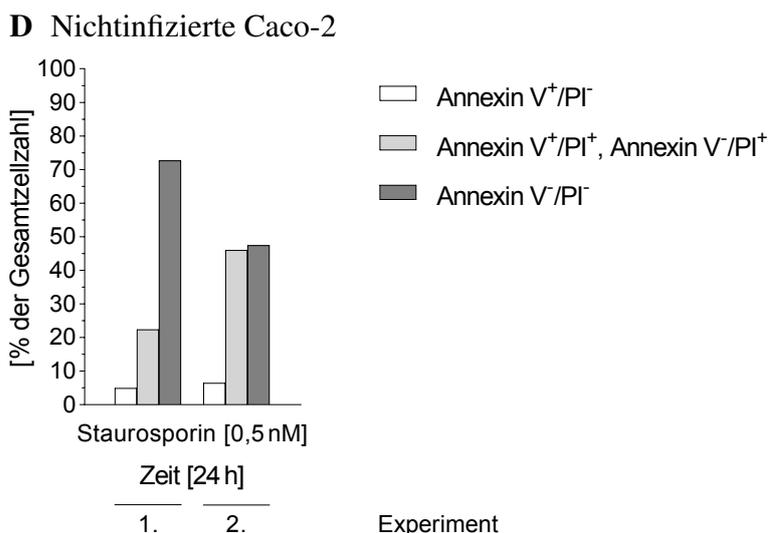


Abb. 6.6 Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmem Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Caco-2 wurden nach einer Inkubationszeit von 6,0 d und 6,5 d mit 2 % (*v/v*) FCS-EMEM erneut mit Medium sowie Bortezomib (2,77 nM (EC₃₅); 4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅); 6,11 nM (EC₉₀)), (S)-MG132 (101 nM (EC₅₀), 157 nM (EC₇₅), 242 nM (EC₉₀)) und dem Lösungsmittel DMSO für 12 h und 24 h inkubiert. Mittels FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI sind nach durchflusszytometrischer Analyse unter Verwendung des BD FACSCalibur™ in **A** Annexin V⁺/PI⁻, in **B** Annexin V⁺/PI⁻, Annexin V⁻/PI⁺- und in **C** Annexin V⁻/PI⁻-Zellen [%] dargestellt. Die DMSO-Konzentrationen entsprachen 6,11 nM Bortezomib sowie 242 nM (S)-MG132. In A, B und C zeigt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Medium-Kontrolle. **D** Nichtinfizierte Apoptose/Nekrose-Kontrolle: 0,5 nM Staurosporin für 24 h. PI = Propidiumiodid. In A, B und C repräsentieren die Ergebnisse den Mittelwert ± Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten. * Proteasominhibitor-behandelte nichtinfizierte Caco-2 vs. nichtinfizierte Medium-Kontrolle. * *p* < 0,05.

Vergleich von Apoptose/Nekrose-Effekten nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei 4-stündiger Anwesenheit von serumarmem Medium und Bortezomib

Nach dem Inkubationszeitraum von 6 d und 20 h mit serumarmem Medium wurden nichtinfizierte und infizierte Caco-2 erneut mit Medium sowie den Proteasominhibitoren (EC₇₅) für 4 h inkubiert und anschließend apoptotische/nekrotische sowie vitale Zellen durchflusszytometrisch analysiert (s. 5.5.2). Die EC₇₅-Konzentration kam zur Anwendung, da nach 12-stündiger Behandlung nichtinfizierter Caco-2 mit Bortezomib der höchste frühapoptotische Wert detektierbar war (s. Abb. 6.6 A).

Aus der Datenauswertung war ersichtlich, dass HCMV anscheinend bei den Caco-2, unter serumarmer Medium-Behandlung, eine gering höhere Annexin V⁺/PI⁻-Zellrate vergleichend zu derjenigen der nichtinfizierten Medium-Kontrolle induzierte. Für Bortezomib konnte ein geringerer Effekt bei den nichtinfizierten sowie gleichermaßen verminderter Effekt bei den infizierten Zellen gegenüber der entsprechenden Medium-Kontrolle analysiert werden. (S)-MG132 zeigte dagegen ausschließlich bei den infizierten Caco-2 einen ebenso verminderten Effekt (s. Abb. 6.7 A).

Die Annexin V⁺/PI⁻- und Annexin V⁻/PI⁺-Zellrate war bei den nichtinfizierten Caco-2 durch serumarmes Medium im Vergleich zu der Annexin V⁺/PI⁻-Zellrate leicht erhöht (s. Abb. 6.7 B, A).

HCMV schien einen gering höheren Effekt gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle zu induzieren. Bortezomib führte bei beiden Zellgruppen zu leicht verminderten Effekten, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, (S)-MG132 lediglich bei den infizierten Caco-2 (s. Abb. 6.7 B).

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse waren in den Raten der Annexin V⁻/PI⁻-Zellen zu finden. HCMV verminderte diese gering in Bezug zu derjenigen der nichtinfizierten Caco-2. Gegenüber der jeweiligen Kontrolle zeigten beide Proteasominhibitoren bei den nichtinfizierten Caco-2 lediglich marginale Unterschiede, bei den infizierten Zellen hingegen leicht höhere Effekte (s. Abb. 6.7 C).

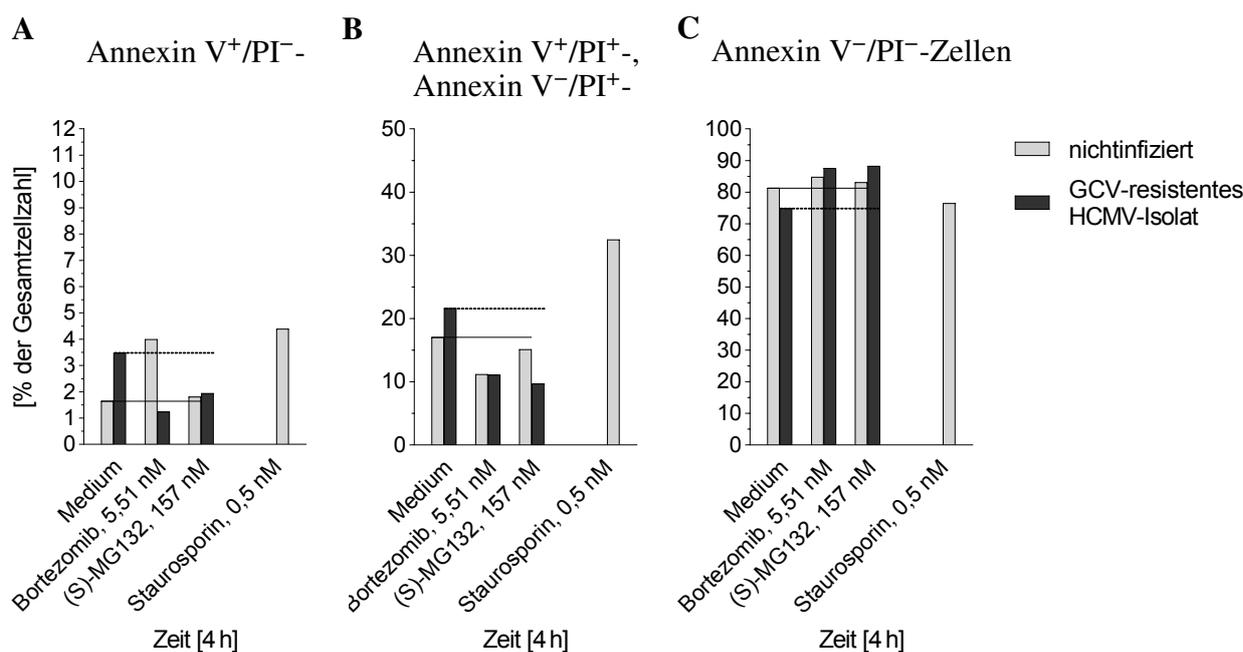


Abb. 6.7 Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei 4-stündiger Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Caco-2 wurden nach einem Inkubationszeitraum von 6,0 d und 20 h mit 2 % (v/v) FCS-EMEM für 4 h erneut mit Medium sowie Bortezomib (5,51 nM (EC₇₅)) und (S)-MG132 (157 nM (EC₇₅)) inkubiert. Unter Verwendung des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI sind nach durchflusszytometrischer Analyse mittels BD FACSCalibur™ in **A** Annexin V⁺/PI⁻, in **B** Annexin V⁺/PI⁺, Annexin V⁻/PI⁺ und in **C** Annexin V⁻/PI⁻-Zellen [%] grafisch gezeigt. Nichtinfizierte Apoptose/Nekrose-Kontrolle: 0,5 nM Staurosporin für 24 h. Die durchgezogene Linie zeigt die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Medium-Kontrolle. PI = Propidiumiodid. Die Ergebnisse von einem Experiment sind repräsentiert.

Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse, dass bei der nichtinfizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 die 4-stündige serumarme Medium-Behandlung, ebenso wie die 12- und 24-stündige, einen leichten prospätapoptotischen/pronekrotischen Effekt induzierte. HCMV zeigte einen geringen profrühapoptotischen wie prospätapoptotischen/pronekrotischen Einfluss. Bortezomib wirkte gegenüber (S)-MG132 bei den nichtinfizierten Caco-2 gering profrühapoptotisch. Beide Proteasominhibitoren induzierten bei den infizierten Zellen geringe antifrühapoptotische sowie insgesamt leichte antispätapoptotische/antinekrotische Effekte. Eine HCMV-Abhängigkeit schien dabei möglich.

6.3.2.2 Vergleich von Apoptose-Effekten mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Für den Nachweis der Veränderung des $\Delta\Psi_M$ erfolgte die Detektion der JC-1-Fluoreszenz-Ratio (J-Monomere / J-Aggregate) unter Verwendung des vorgenannten Assays. Dazu wurden nichtinfizierte und infizierte Caco-2 nach der 6,0- und 6,5-tägigen Inkubation mit serumarmen Medium erneut mit Medium (Kontrolle) sowie den aufsteigenden EC-Konzentrationen der Proteasominhibitoren für 12 h und 24 h behandelt. Die entsprechende JC-1-Fluoreszenz-Ratio war gegen diejenige der nichtinfizierten Medium-Kontrolle normalisiert [%] (s. 5.1.8).

Die Datenanalyse ergab, dass HCMV sowohl bei der 12- als auch bei der 24-stündigen serumarmen Medium-Behandlung der Caco-2 einen signifikanten mittleren verminderten Effekt induzierte, verglichen mit der nichtinfizierten Medium-Kontrolle (s. Abb. 6.8 A). Bortezomib (4,01 nM (EC_{50});

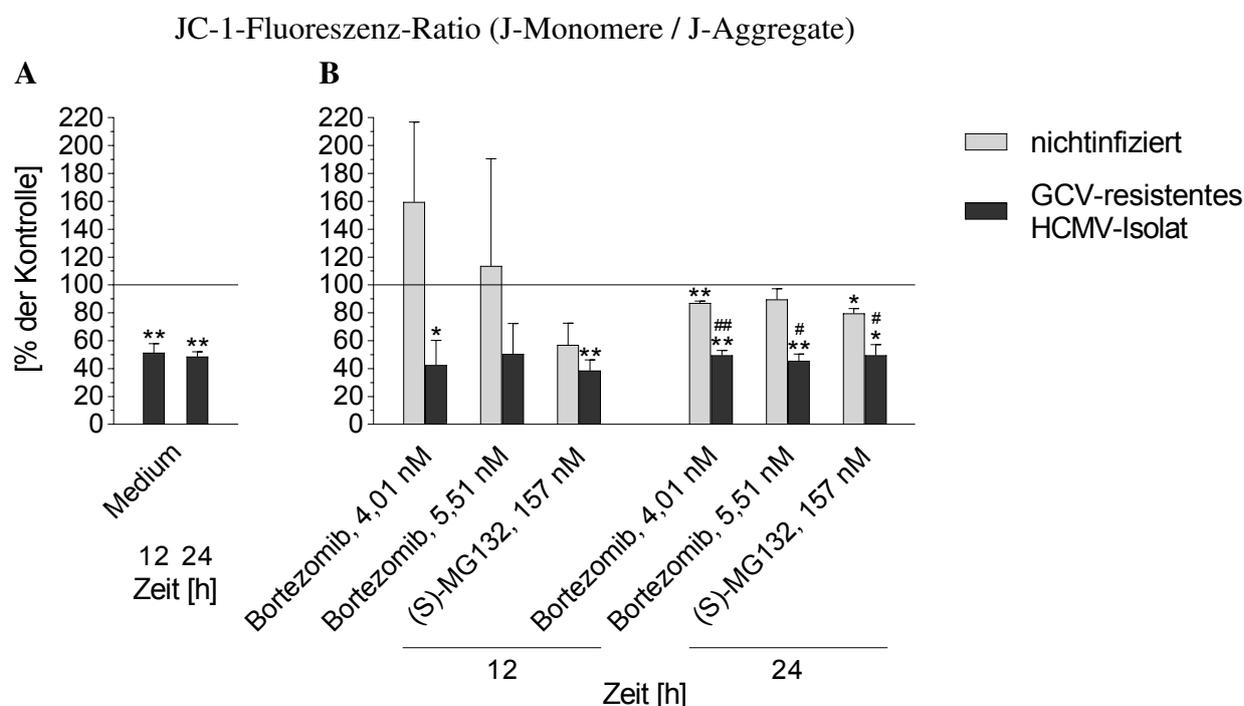


Abb. 6.8 Sehr frühe Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Nach 12- und 24-stündiger Behandlung nichtinfizierter und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierter Caco-2 mit 2 % (*v/v*) FCS-EMEM, Bortezomib (4,01 nM (EC_{50}); 5,51 nM (EC_{75})) sowie (S)-MG132 (157 nM (EC_{75})) wurden die Fluoreszenzen und die jeweilige Ratio (J-Monomere / J-Aggregate) nach Durchführung des oben erwähnten Assays am Mikroplattenleser Mithras LB 940 detektiert. Die Zellen inkubierten zuvor für 6,0 d und 6,5 d mit serumarmen Medium. **A** zeigt die JC-1-Fluoreszenz-Ratio [%] der Medium-behandelten infizierten und **B** die der Proteasominhibitor-behandelten nichtinfizierten und infizierten Caco-2 normalisiert gegen diejenige der nichtinfizierten Medium-Kontrolle (als 100 % definiert, durchgezogene Linie). Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten. *, ** Medium-behandelte infizierte sowie Proteasominhibitor-behandelte nichtinfizierte und infizierte Caco-2 vs. nichtinfizierte Medium-Kontrolle, #, ## Proteasominhibitor-behandelte infizierte vs. Proteasominhibitor-behandelte nichtinfizierte Caco-2. *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$.

5,51 nM (EC₇₅) und (S)-MG132 (157 nM (EC₇₅)) zeigten bei den infizierten Caco-2 den gleichen Trend sowie nach 24 h zudem im Vergleich zu den entsprechend behandelten nichtinfizierten Zellen. Im Gegensatz zu den leicht bis gering höheren Effekten nach 12-stündiger Behandlung nichtinfizierter Caco-2 mit Bortezomib gegenüber der Kontrolle, lagen nach 24 h signifikante gering verminderte Effekte vor. Für (S)-MG132 war dies zu beiden Zeitpunkten beobachtbar (s. Abb. 6.8 B).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass HCMV sowohl bei 12-stündiger als auch bei 24-stündiger serumarmer Medium-Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 einen mittleren inhibitorischen Effekt auf sehr frühe Ereignisse der Apoptose-Kaskade induzierte. Desgleichen schien HCMV die proapoptotische Wirkung von Bortezomib sowie (S)-MG132 zu inhibieren. Bei den nichtinfizierten Caco-2 zeigte Bortezomib zuerst einen leichten proapoptotischen Einfluss, im zeitlichen Verlauf wurde dieser gleichermaßen antiapoptotisch. (S)-MG132 hingegen bewirkte frühzeitig bei beiden Zellgruppen einen leichten antiapoptotischen Effekt.

6.3.2.3 Vergleich von Apoptose-Effekten mittels Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Für die Erfassung der Apoptose erfolgte die Detektion Histon-assoziiierter DNA-Fragmente durch den erwähnten ELISA vorgenannter Caco-2 nach entsprechender Behandlung. Die jeweilige Absorption wurde gegen diejenige der nichtinfizierten Medium-Kontrolle normalisiert [%] (s. 5.4.2).

Die Datenauswertung ergab, dass HCMV anscheinend bei den Caco-2 im Gegensatz zu der 12-stündigen serumarmen Medium-Behandlung nach 24 h einen leicht verminderten Effekt induzierte. Ein Unterschied im Vergleich zu der nichtinfizierten Medium-Kontrolle war zudem nicht erkennlich (s. Abb. 6.9 A). Sowohl Bortezomib (4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅)) als auch (S)-MG132 (157 nM (EC₇₅)) führten nach 12 h bei den nichtinfizierten Caco-2, gegenüber der Kontrolle, zu signifikanten gering bis mittleren höheren Effekten, bei den infizierten Zellen waren die Effekte weniger ausgeprägt. Nach 24 h zeigte sich ein gegenteiliger Trend. Für beide Zeitpunkte konnten bei den Proteasominhibitor-behandelten infizierten Caco-2 im Vergleich zu den jeweiligen nichtinfizierten Zellen keine signifikanten Effekte beobachtet werden (s. Abb. 6.9 B). Gegenüber der infizierten Medium-Behandlung lagen nach 24 h für beide Inhibitoren gering verminderte Effekte bei den infizierten Caco-2 vor (s. Abb. 6.9 A, B).

Zusammenfassend war zu vermuten, dass HCMV nach 24-stündiger serumarmer Medium-Behandlung gegenüber der 12-stündigen Behandlung bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 geringer proapoptotisch wirkte und zudem die proapoptotische Wirkung beider Proteasominhibitoren zu blockieren schien. Bei den nichtinfizierten Caco-2 wurde der durch die Proteasominhibitoren zunächst induzierte leichte proapoptotische Effekt im zeitlichen Verlauf gleichermaßen antiapoptotisch.

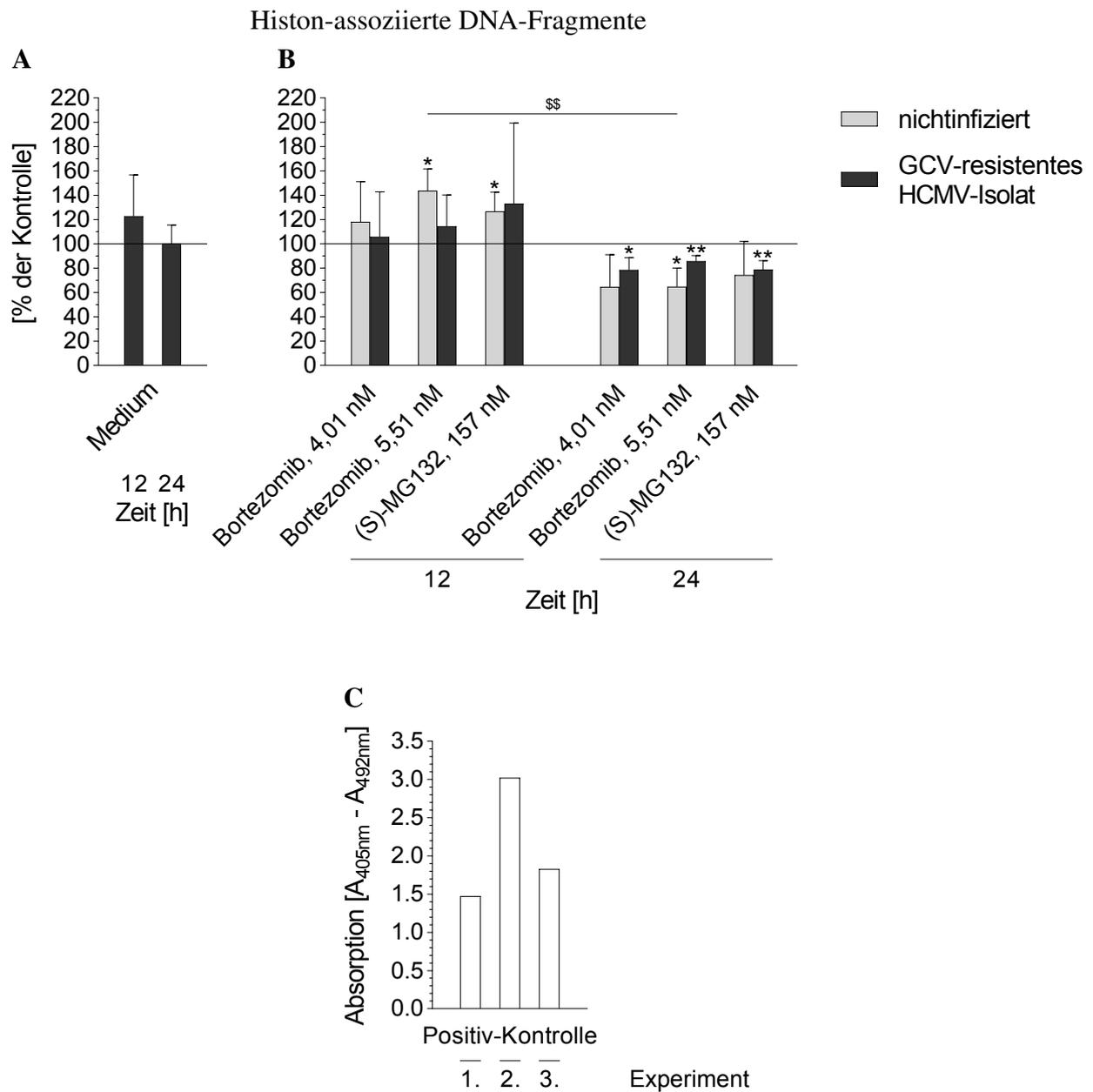


Abb. 6.9 Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Caco-2 wurden für 12 h und 24 h mit 2 % (v/v) FCS-EMEM, Bortezomib (4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅)) sowie (S)-MG132 (157 nM (EC₇₅)) behandelt. Für 6,0 d und 6,5 d inkubierten die Zellen zunächst mit serumarmen Medium. Die Absorptionen konnten nach Durchführung des vorgenannten ELISA am Mikroplattenleser SunriseTM spektrophotometrisch bestimmt werden. **A** stellt die Histon-assoziierten DNA-Fragmente [%] der Medium-behandelten infizierten und **B** die der Proteasominhibitor-behandelten nichtinfizierten und infizierten Caco-2 normalisiert gegen diejenige der nichtinfizierten Medium-Kontrolle (als 100 % definiert, durchgezogene Linie) dar. **C** Die Positiv-Kontrolle entsprach der Firmen-Positiv-Kontrolle. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *, ** Proteasominhibitor-behandelte nichtinfizierte und infizierte Caco-2 vs. nichtinfizierte Medium-Kontrolle, ^{\$\$} 24-stündige vs. 12-stündige Behandlung. * $p < 0,05$; **, ^{\$\$} $p < 0,01$.

6.3.2.4 Vergleich von Nekrose-Effekten mittels PicoGreen®-Assay

Nach entsprechender Behandlung der oben erwähnten Caco-2 wurde das Ausmaß der Nekrose mithilfe der Konzentrationsbestimmung von dsDNA, unter Verwendung des PicoGreen®-Assays und einer DNA-Standardkurve, bei den Zellkulturüberständen analysiert (s. 6.3.2.3). Die Normalisierung der jeweiligen Konzentration von dsDNA erfolgte gegen diejenige der nichtinfizierten Medium-Kontrolle [%] (s. 5.2.1).

Zusammenfassend ergab die Analyse der Daten, dass bei 12- und 24-stündiger Anwesenheit von serumarmen Medium, Bortezomib sowie (S)-MG132 keine Effekte beobachtet werden konnten, so dass weder HCMV noch die Proteasominhibitoren zu diesen Zeitpunkten vermehrt Nekrosen sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Caco-2 im Vergleich zu der nichtinfizierten Medium-Kontrolle induzierten. Allenfalls die 12-stündige Behandlung nichtinfizierter Zellen mit 157 nM (EC₇₅) (S)-MG132 führte zu einem signifikanten marginal verminderten Effekt gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 6.10 A, B).

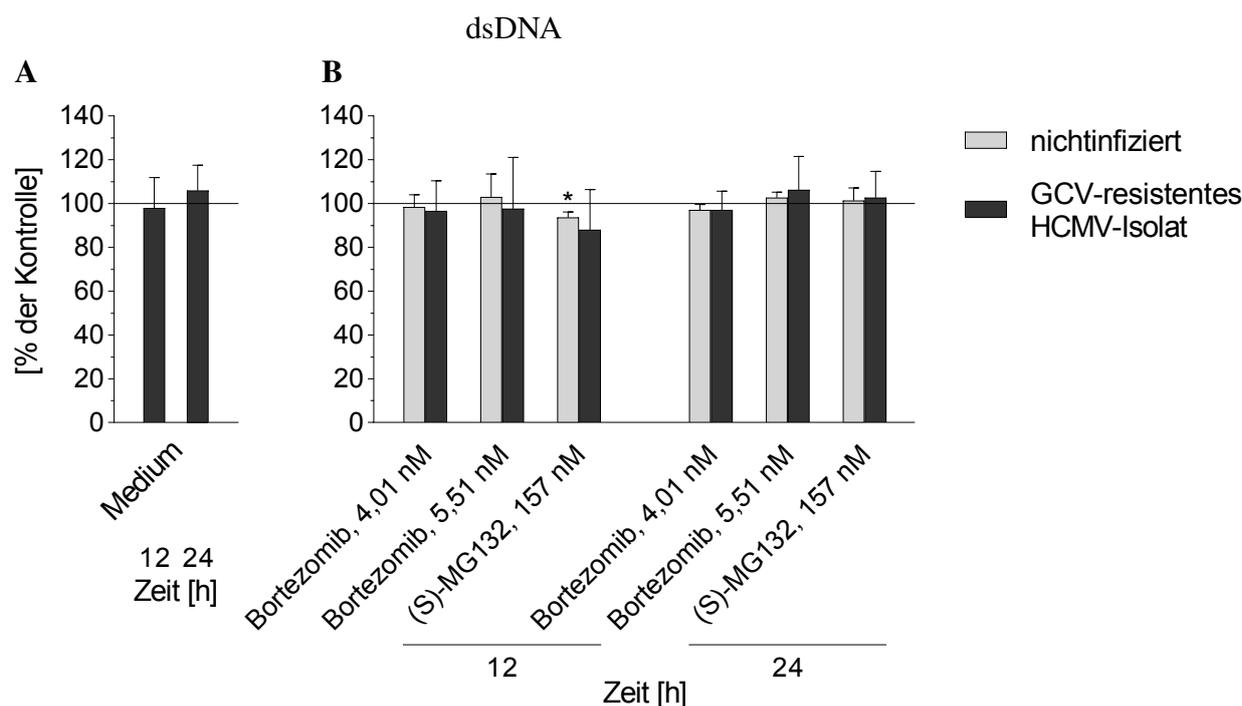


Abb. 6.10 Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei kürzerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels PicoGreen®-Assay

Für 12 h und 24 h inkubierten nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Caco-2 mit 2 % (v/v) FCS-EMEM, Bortezomib (4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅)) sowie (S)-MG132 (157 nM (EC₇₅)). Zuvor wurden die Zellen für 6,0 d und 6,5 d mit serumarmen Medium kultiviert. Nach Durchführung des oben erwähnten Assays erfolgte die Detektion der Fluoreszenzen am Mikroplattenleser Mithras LB920 und die Konzentrationsbestimmung von dsDNA [ng/ml] der Zellkulturüberstände per DNA-Standardkurve. **A** zeigt die Konzentrationen von dsDNA [%] der Medium-behandelten infizierten und **B** die der Proteasominhibitor-behandelten nichtinfizierten und infizierten Caco-2 normalisiert gegen diejenige der nichtinfizierten Medium-Kontrolle (als 100 % definiert, durchgezogene Linie). Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. * Proteasominhibitor-behandelte nichtinfizierte Caco-2 vs. nichtinfizierte Medium-Kontrolle. * $p < 0,05$.

6.4 Effekte der Ko-Kultur der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit primären Fibroblasten

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 durch die Ko-Infektion mithilfe infizierter Fibroblasten adäquat mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat infiziert werden kann. Im Anschluss an den Nachweis der Permissivität der Ko-Kultur für HCMV sollte im Hinblick auf die Apoptose/Nekrose-Effekte der Caco-2-Mono-Kultur bei 7-tägiger Anwesenheit von HCMV und/oder Bortezomib deren Einfluss auf das Apoptose/Nekrose-Verhalten bei der Ko-Kultur durch folgende Experimente charakterisiert werden. HELF Fi301 und (S)-MG132 dienten bei den Untersuchungen jeweils als Kontrolle.

6.4.1 Nachweis der Ko-Kultur von Caco-2 mit primären Fibroblasten

Die Ko-Kultur sowie Aussaat der Caco-2 mit HELF Fi301 oder HFF erfolgten im Verhältnis von 2 : 1 (s. 5.1.9). In der Abbildung 6.11 ist die sternenförmige Zellanordnung der Fibroblasten zwischen den Kolonkarzinomzellen, welche die Fibroblasten im zeitlichen Verlauf überwucherten, ersichtlich.

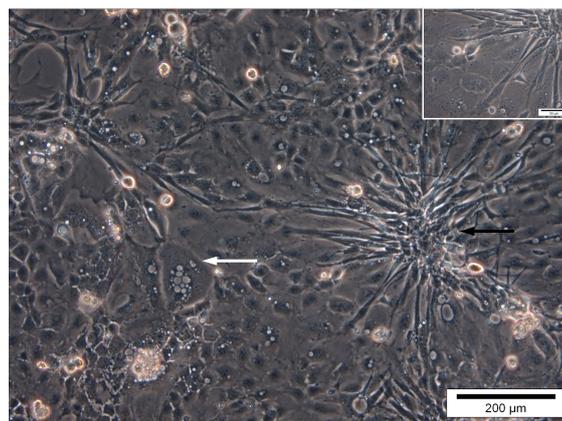


Abb. 6.11 Mikroskopische Darstellung der Ko-Kultur der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit der primären Fibroblastenzelllinie HELF Fi301

Caco-2 wurden im Verhältnis von 2 : 1 mit HELF Fi301 gemischt, in 10 % (v/v) FCS-EMEM für 4 d kultiviert und im Anschluss durch die Phasenkontrastmikroskopie repräsentiert. Der weiße Pfeil zeigt exemplarisch eine Kolonkarzinomzelle und der schwarze Pfeil die sternenförmige Anordnung der Fibroblasten. Der Größenstandard entspricht 200 µm im großen Bild und 50 µm im kleinen Bild. Bildanpassung: Helligkeit und Kontrast.

6.4.2 Einfluss der Ko-Kultur und Ko-Infektion auf die HCMV-Infektion der Caco-2

Da sich für die Kolonkarzinomzelllinie nach Infektion mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 eine hohe Infektionsrate mittels Expressionsrate von IE1/IE2 gegenüber den nichtinfizierten Zellen nachweisen ließ (s. Abb. 6.1 B), wurden zur optimalen vergleichenden Überprüfung der Infektionsrate der Ko-Kultur die Zellen mithilfe einer Virussuspension niedrigen HCMV-Titers vermindert infiziert. Weiterhin erfolgte die Infektion nichtvorbehandelter Caco-2 mit

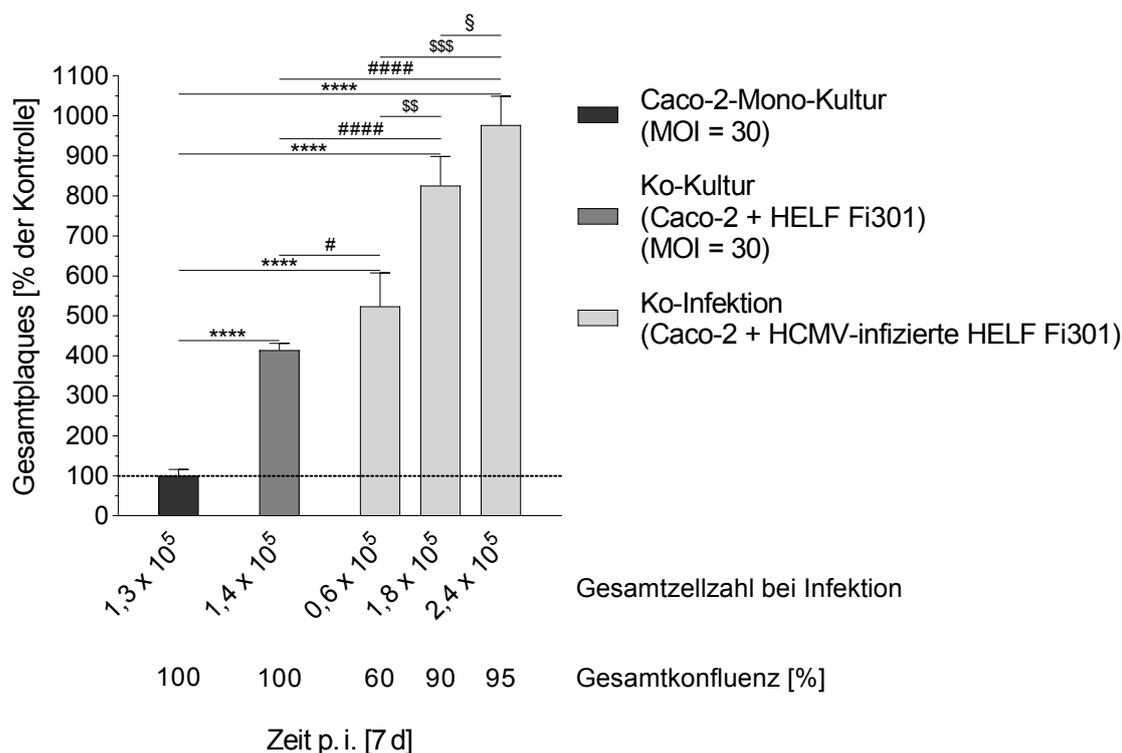


Abb. 6.12 Effekte der Ko-Kultur und Ko-Infektion auf die HCMV-Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2
 Caco-2-Mono-Kulturen (6×10^4) sowie Ko-Kulturen (4×10^4 Caco-2 und 2×10^4 HELF Fi301 gemischt) wurden 72 h nach Aussaat mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30, niedrigen Titer, infiziert und mit Methocel überschichtet. Zugleich erfolgte die Mischung nichtvorbehandelter Caco-2 mit HCMV-infizierten HELF Fi301 definierter Zellzahlen in Methocel (Ko-Infektion). Die entsprechenden nichtinfizierten Zellen wurden mitgeführt. Nach 7 d p. i. konnten die Zellen für den Plaquereduktionsassay fixiert werden. Als spezifischer Primärantikörper diente *Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus, Clones CCH2 + DDG9*, gegen die sehr frühen viralen Proteine IE1/IE2 sowie als Sekundärantikörper *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP*. Die Gesamtplaques wurden lichtmikroskopisch quantifiziert. Dargestellt sind jeweils die Gesamtplaques [%] normalisiert gegen diejenigen der infizierten Caco-2-Mono-Kultur (als 100 % definiert, gestrichelte Linie). Die Gesamtzellzahl bei Infektion, bestimmt mittels Trypanblau-Ausschlusstest, wurde aus vier Experimenten gemittelt. Die Gesamtkonfluenz [%] war lichtmikroskopisch geschätzt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. **** infizierte Ko-Kultur, Ko-Infektionen vs. infizierte Caco-2-Mono-Kultur, #, ##### Ko-Infektionen vs. infizierte Ko-Kultur, \$\$, \$\$\$ $1,8 \times 10^5$; $2,4 \times 10^5$ vs. $0,6 \times 10^5$ der Ko-Infektionen, § $2,4 \times 10^5$ vs. $1,8 \times 10^5$ der Ko-Infektionen. #. § $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$; ****, ##### $p < 0,0001$.

HCMV-infizierten HELF Fi301 (Ko-Infektion) (s. 5.1.9). Für den sich nach 7 d p. i. anschließenden Plaquereduktionsassay kam ein spezifischer Primärantikörper gegen HCMV-IE1/IE2 zur Anwendung, als Sekundärantikörper diente ein Anti-Maus-IgG/HRP-Konjugat. Die lichtmikroskopisch detektierten Gesamtplaques wurden gegen diejenigen der infizierten Caco-2-Mono-Kultur (Kontrolle) prozentual ins Verhältnis gesetzt (s. 5.1.6). Die Datenauswertung zeigte, dass sowohl für die Ko-Kultur als auch für die Ko-Infektion signifikante stark höhere Gesamtinfektionsraten mittels Gesamtexpressionsraten von IE1/IE2 gegenüber derjenigen der infizierten Mono-Kultur nachweisbar waren. Bei den nichtinfizierten Kulturen wurden erwartungsgemäß keine viralen Proteine analysiert (grafisch nicht dargestellt). Der definierten Gesamtzellzahl $2,4 \times 10^5$ der Ko-Infektion lag die Gesamtzellzahl der infizierten Ko-Kultur bei einer Konfluenz von 100 % nach 7-tägiger Inkubation

zugrunde (s. Abb. 6.16 A, links). Die erwähnte Konfluenz konnte jedoch für die entsprechende Ko-Infektion nicht bestimmt werden (s. Abb. 6.12). Nach 12 h p. i., wie auch im gesamten Untersuchungszeitraum, war lichtmikroskopisch zu beobachten, dass die Ausbreitung der Caco-2 nicht derjenigen der Ko-Kultur entsprach und sich ein geringer Anteil avitaler Zellen im Zellkulturüberstand befand.

Für die phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Effekte der Ko-Infektion erfolgte das vorgenannte Experiment mit den Gesamtzellzahlen 3×10^5 (s. Abb. 6.13 A, B, C) sowie 6×10^5 (s. Abb. 6.13 D, E, F). Aus der Abbildung 6.13 ist ersichtlich, dass sich für die Ko-Infektion niedrigerer Ausgangszellzahl unterschiedliche Infektionsgrade sowie Destruktionen verschiedenster Ausprägungen in Form von Löchern im Monolayer mit dem entsprechenden Anteil avitaler Zellen im Zellkulturüberstand nachweisen ließ, welches bereits nach 12 h p. i. lichtmikroskopisch beobachtet werden konnte (s. Abb. 6.13 A, B; weißer Pfeil). Interessanterweise waren demgegenüber stärkere Zellproliferationen im Sinne von großen sowie infizierten Proliferationsinseln bei höherer Ausgangszellzahl analysierbar (s. Abb. 6.13 D, E; schwarzer Pfeil). Die veranschaulichten nichtinfizierten Ko-Infektionen beider Ausgangszellzahlen waren hoch proliferierend. Bild in Bild zeigt strangförmig verlaufende HELF Fi301 zu den Caco-2 (s. Abb. 6.13 C, F).

Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen der Untersuchungen möglicherweise angenommen werden, dass die permanente Infektion nichtvorbehandelter Caco-2 durch HCMV-infizierte HELF Fi301 eine mögliche Methode darstellt, um eine hohe Infektionsrate der Kolonkarzinomzelllinie effizient und effektiv zu erreichen. Des Weiteren könnte zellzahlabhängig sowie HCMV-titerabhängig entweder ein CPE oder eine Proliferationserhöhung und hohe Infektionsrate bei den Caco-2 induziert werden.

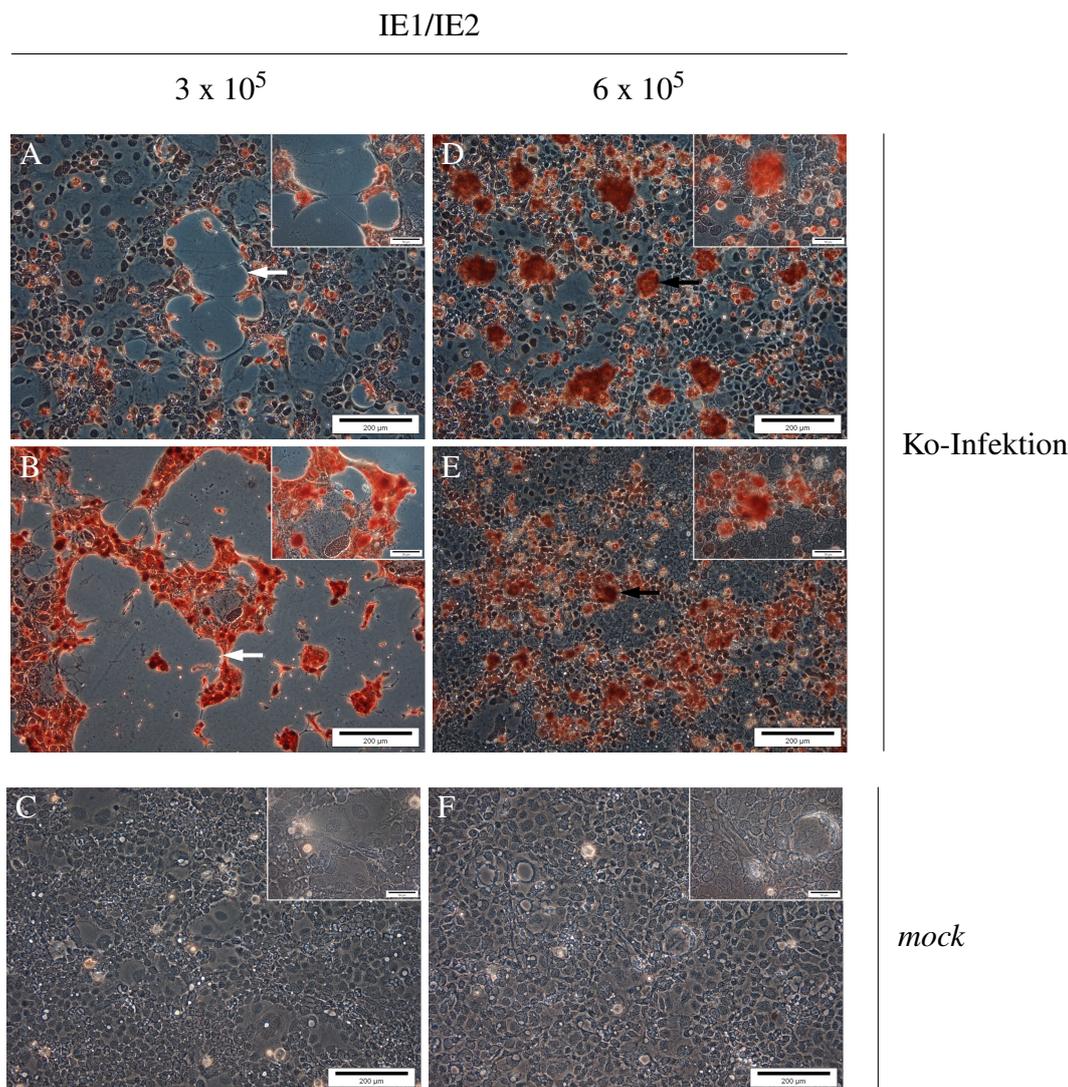


Abb. 6.13 Mikroskopische Darstellung des Effektes der Ko-Infektion bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2
 In A, B und C betrug bei Aussaat in Zellkulturschalen (\varnothing 35 x 10 mm) die Gesamtzellzahl 3×10^5 , in D, E und F 6×10^5 . Ein Verhältnis von 2 : 1 nichtvorbehandelter Caco-2 zu HCMV-infizierten HELF Fi301 (Ko-Infektion) (A, B, D, E) sowie nichtinfizierten HELF Fi301 (*mock*) (C, F) kam zur Anwendung. Die gemischten Zellen wurden mit Methocel überschichtet und nach 7 d p. i. fixiert. Die mittels Plaquereduktionsassay visualisierten Gesamtplaques sind anhand der Phasenkontrastmikroskopie dargestellt. Als Primärantikörper diente *Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus, Clones CCH2 + DDG9*, gegen die sehr frühen viralen Proteine IE1/IE2 sowie *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP* als Sekundärantikörper. A und B zeigen unterschiedliche Grade der Monolayerdestruktion (weißer Pfeil), D und E dagegen große sowie infizierte Proliferationsinseln (schwarzer Pfeil). Der Größenstandard entspricht 200 μ m im großen Bild und 50 μ m im kleinen Bild. Für die Ko-Infektion sind separat die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten repräsentiert. Für *mock* zeigt die Darstellung ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

6.4.3 Einfluss von HCMV und/oder Bortezomib bei längerer Gegenwart auf die Apoptose/Nekrose bei der Ko-Kultur

Nach Überprüfung der Permissivität der Ko-Kultur für HCMV anhand der Western-Blot-Analyse wurden bei 7-tägiger Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib Apoptose/Nekrose-Effekte bei den nichtinfizierten und HCMV-infizierten Ko-Kulturen gleichfalls durch den Western-Blot sowie mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Untersuchungen zum Proliferationsverhal-

ten erfolgten unter Verwendung des Trypanblau-Ausschlusstests.

6.4.3.1 Nachweis der Permissivität der Ko-Kultur für HCMV und Vergleich von Apoptose-Effekten mittels Western-Blot

Die Gesamtexpression viraler Proteine und des proapoptotischen Proteins Bax wurde bei den unter 6.4.3 erwähnten Ko-Kulturen nach der entsprechenden zeitlichen Behandlung mit serumarmen Medium sowie den aufsteigenden EC-Konzentrationen der Proteasominhibitoren mithilfe des Western-Blots untersucht (s. 5.4.3). Bax ist der Bcl-2-Familie zugehörig und wirkt, induziert durch das Tumorsuppressorprotein p53, beschleunigt proapoptotisch [189, 190].

Die Western-Blot-Analyse erbrachte den Nachweis der Gesamtexpression von IE1, pUL44 sowie pp28 der Medium-behandelten infizierten Ko-Kultur (infizierte Medium-Kontrolle) gegenüber der entsprechenden nichtinfizierten Ko-Kultur (nichtinfizierte Medium-Kontrolle) (s. Abb. 6.14; Spur 9, 4). Bei den infizierten HELF Fi301 war die Gesamtexpression der oben erwähnten viralen Proteine erwartungsgemäß zu sehen (s. Abb. 6.14; Spur 2, 1).

Sowohl Bortezomib als auch (S)-MG132 zeigten bei der infizierten Ko-Kultur weder mit den niedrigeren EC-Konzentrationen (2,77 nM (EC₃₅), 101 nM (EC₅₀)) noch mit den höheren EC-Konzentrationen (4,01 nM (EC₅₀), 157 nM (EC₇₅)) Unterschiede bezüglich der IE1-Gesamtexpression, verglichen mit derjenigen der infizierten Medium-Kontrolle. Bortezomib führte dagegen mit Konzentrationssteigerung zu einer gering verminderten pUL44-Gesamtexpression, für (S)-MG132 ließ sich kein Unterschied erkennen. Die pp28-Gesamtexpression der infizierten Ko-Kultur nach Behandlung mit der höheren EC-Konzentration von Bortezomib schien lediglich gegenüber der niedrigeren EC-Konzentration sehr gering vermindert zu sein, jedoch nicht gegenüber der infizierten Medium-Kontrolle. Für (S)-MG132 hingegen konnte bei Gegenwart der höheren EC-Konzentration ein gering vermindertes Effekt im Vergleich zu der niedrigeren Konzentration wie zu der infizierten Kontrolle beobachtet werden (s. Abb. 6.14, Spur 9–13).

Bezüglich der Bax-Gesamtexpression schien HCMV bei der Ko-Kultur, unter serumarmer Medium-Behandlung, gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle die Apoptose marginal zu inhibieren (s. Abb. 6.14; Spur 9, 4). Im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle induzierte Bortezomib bei den nichtinfizierten Ko-Kulturen mit der niedrigeren EC-Konzentration einen gering höheren Effekt, mit der höheren EC-Konzentration war der Effekt gleichermaßen vermindert (s. Abb. 6.14, Spur 4–6). Bei den infizierten Ko-Kulturen zeigten sich demgegenüber konzentrationsabhängige marginal höhere Effekte (s. Abb. 6.14, Spur 9–11). Für (S)-MG132 ließ sich jeweils ein gegenteiliger Trend erkennen (s. Abb. 6.14; Spur 4, 7, 8; 9, 12, 13).

Konzentration (157 nM (EC₇₅)) (S)-MG132) eine gering höhere Annexin V⁺/PI⁻- und V⁻/PI⁺-Gesamtzellrate bei der infizierten Ko-Kultur gegenüber derjenigen der jeweiligen Medium-Kontrolle induzierte (s. Abb. 6.15 B).

HCMV schien bei der Ko-Kultur, unter serumarmer Medium-Behandlung, zu einer gering verminderten Annexin V⁺/PI⁻-Gesamtzellrate, verglichen mit derjenigen der nichtinfizierten Medium-Kontrolle, zu führen (s. Abb. 6.15 A, links). Bortezomib zeigte mit Konzentrationssteigerung (2,77 nM (EC₃₅); 4,01 nM (EC₅₀)) sehr gering verminderte Effekte bei den nichtinfizierten Ko-Kulturen gegenüber der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle. Bei den infizierten Ko-Kulturen ließ sich ausschließlich für die höchste EC-Konzentration (5,51 nM (EC₇₅)) ein gering höherer Effekt, entsprechend vergleichend, analysieren. Für (S)-MG132 waren hingegen insgesamt keine Unterschiede beobachtbar (s. Abb. 6.15 A, rechts).

Serumarmes Medium führte bei der nichtinfizierten Ko-Kultur zu einer marginal höheren Annexin V⁺/PI⁻- und V⁻/PI⁺-Gesamtzellrate im Vergleich zu der Annexin V⁺/PI⁻-Gesamtzellrate (s. Abb. 6.15 B, A; links). Für beide Zellgruppen lagen in Gegenwart von serumarmen Medium annähernd identische Annexin V⁺/PI⁻- und V⁻/PI⁺-Gesamtzellraten vor (s. Abb. 6.15 B, links). Bortezomib zeigte, verglichen mit der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle, mit Konzentrationsanstieg (2,77 nM; 4,01 nM) bei den nichtinfizierten Ko-Kulturen sehr gering verminderte Effekte, bei den infizierten Ko-Kulturen allenfalls mit der niedrigeren EC-Konzentration (2,77 nM). Demgegenüber induzierte (S)-MG132 bei beiden Zellgruppen sehr gering verminderte Effekte, deutlicher mit der niedrigeren EC-Konzentration (101 nM (EC₅₀)) (s. Abb. 6.15 B, rechts).

Die zuvor erwähnten Ergebnisse fanden sich in den Raten Annexin V⁻/PI⁻-Gesamtzellen. Für HCMV war gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle ein gering höherer Effekt zu verzeichnen (s. Abb. 6.15 C, links). Im Vergleich zu der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle führten die Inhibitoren bei den Zellgruppen zu sehr gering höheren Effekten. Lediglich für die höchste EC-Konzentration von Bortezomib lag bei der infizierten Ko-Kultur ein marginal verminderter Effekt vor, die mittlere EC-Konzentration (4,47 nM) zeigte keinen Effekt (s. Abb. 6.15 C, rechts).

Zusammenfassend ließ sich aus den Untersuchungen deuten, dass die 7-tägige serumarme Medium-Behandlung bei der nichtinfizierten Ko-Kultur einen geringen prospätaoptotischen/pronekrotischen Effekt induzierte. HCMV zeigte hingegen einen geringen antifrühapoptotischen Einfluss. Bortezomib wirkte bei der nichtinfizierten Ko-Kultur konzentrationsabhängig marginal antifrühapoptotisch wie antispätaoptotisch/antinekrotisch. Bei der infizierten Ko-Kultur war der Einfluss lediglich gering proführapoptotisch. (S)-MG132 zeigte dagegen bei beiden Zellgruppen höchsten einen sehr geringen antispätaoptotischen/antinekrotischen Effekt.

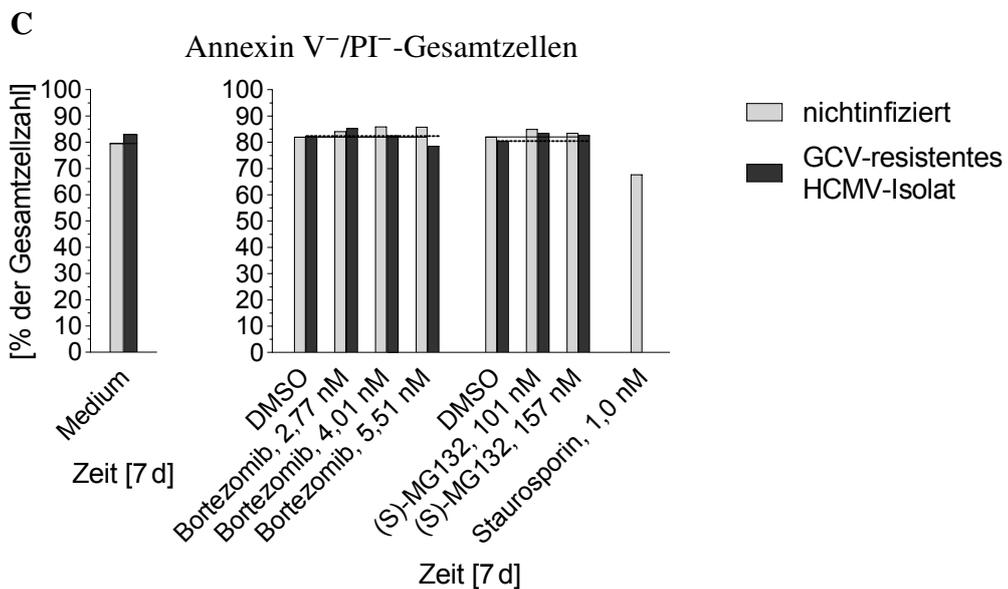
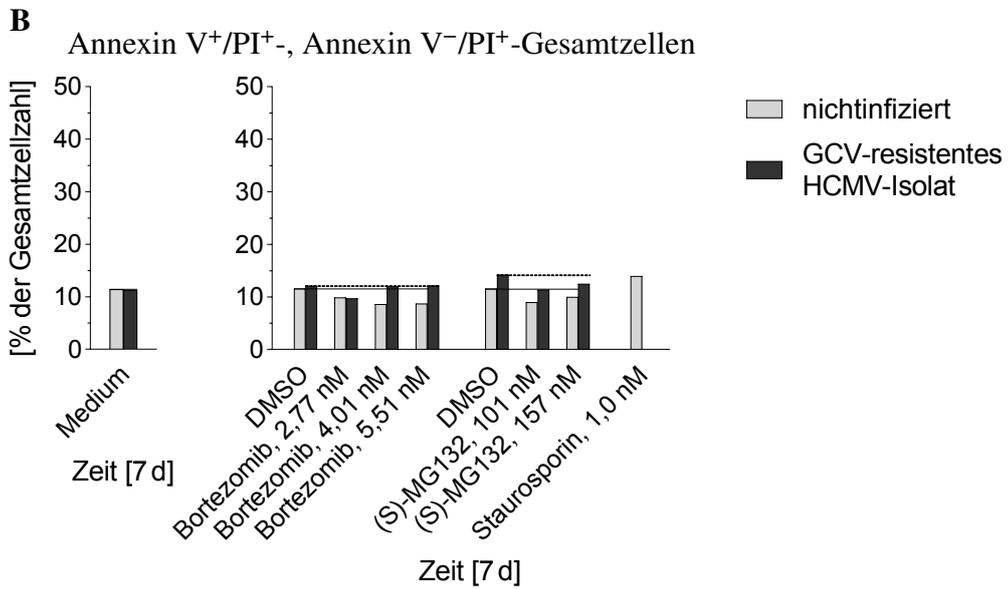
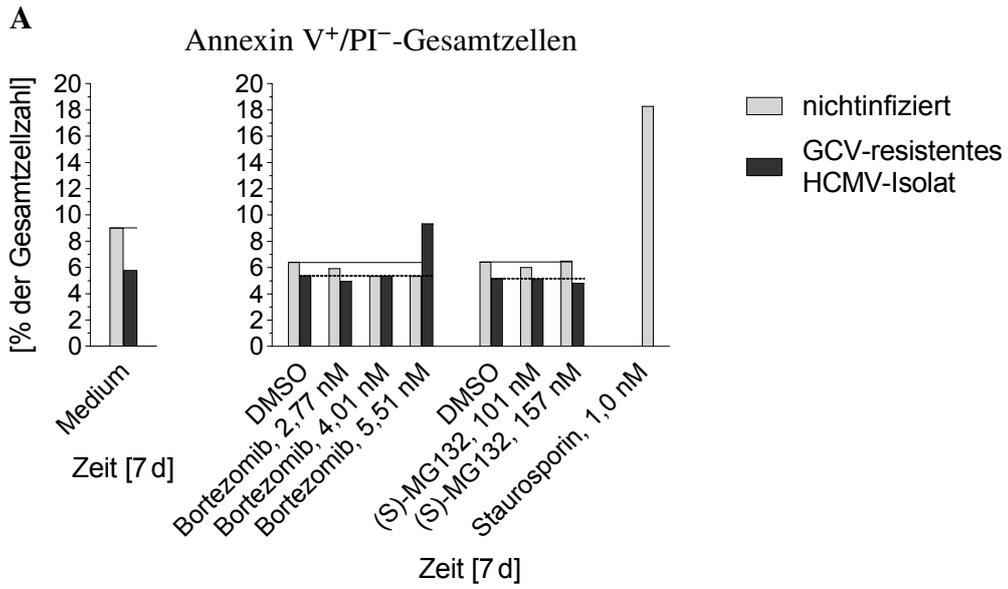


Abb. 6.15 Apoptose/Nekrose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Ko-Kulturen bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib detektiert mittels Durchflusszytometrie

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierte Ko-Kulturen wurden für 7 d mit 2 % (v/v) FCS-EMEM sowie Bortezomib (2,77 nM (EC₃₅); 4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅)), (S)-MG132 (101 nM (EC₅₀), 157 nM (EC₇₅)) und dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Unter Verwendung des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mittels BD FACSCalibur™. Dargestellt sind in **A** Annexin V⁺/PI⁻, in **B** Annexin V⁺/PI⁺, Annexin V⁻/PI⁻ und in **C** Annexin V⁻/PI⁻-Gesamtzellen [%], links nach Inkubation der Ko-Kulturen mit Medium und rechts mit den Proteasominhibitoren sowie dem Lösungsmittel. Die DMSO-Konzentrationen entsprachen 5,51 nM Bortezomib sowie 157 nM (S)-MG132. Nichtinfizierte Apoptose/Nekrose-Kontrolle: 1,0 nM Staurosporin für 16 h. In den linken Graphen zeigt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten Medium-Kontrolle. In den rechten Graphen präsentiert die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Lösungsmittel-Kontrolle. PI=Propidiumiodid. Die Ergebnisse von einem Experiment sind repräsentiert.

Vergleich der Proliferation und Vitalität von Caco-2-Mono- sowie Ko-Kulturen

Durch den Trypanblau-Ausschlusstest wurden Proliferation und Vitalität nichtinfizierter und infizierter Caco-2-Mono- und Ko-Kulturen nach 7-tägiger Behandlung mit serumarmen Medium (Kontrollen), den aufsteigenden EC-Konzentrationen von Bortezomib sowie dem Lösungsmittel DMSO (Kontrollen) überprüft (s. 5.1.3).

Die Datenanalyse ergab, dass DMSO bezüglich der Gesamtzellzahl bei der nichtinfizierten und infizierten Mono- sowie Ko-Kultur gering bis leicht verminderte Effekte gegenüber derjenigen der entsprechenden Medium-Kontrolle zeigte (s. Abb. 6.16 A). HCMV führte bei der Mono-Kultur, unter serumarmen Medium, im Vergleich zu der nichtinfizierten Medium-Kontrolle zu einem leicht verminderten Effekt. Verglichen mit der jeweiligen Mono-Kultur zeigte die nichtinfizierte Ko-Kultur bei Anwesenheit von serumarmen Medium einen stark höheren Effekt, die infizierte Ko-Kultur hingegen einen mittleren entsprechenden Effekt (s. Abb. 6.16 A, links). Für Bortezomib waren mit Konzentrationsanstieg (4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅); 6,11 nM (EC₉₀)) sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Mono- sowie Ko-Kulturen gering bis stark verminderte Effekte gegenüber der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle erkennbar (s. Abb. 6.16 A, rechts).

Die Rate der Gesamtvitalität wurde durch DMSO, verglichen mit derjenigen der entsprechenden Medium-Kontrolle, bei der infizierten Mono- wie Ko-Kultur scheinbar leicht vermindert, bei der nichtinfizierten Mono-Kultur allenfalls gering (s. Abb. 6.16 B). Für HCMV war bei der Ko-Kultur, unter serumarmen Medium, ein sehr geringer Unterschied gegenüber der jeweiligen nichtinfizierten Medium-Kontrolle sowie Mono-Kultur erkennbar (s. Abb. 6.16 B, links). Im Vergleich zu der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle induzierte Bortezomib mit den höheren EC-Konzentrationen (5,51 nM; 6,11 nM) bei den nichtinfizierten Mono-Kulturen gering bis leicht verminderte Effekte, bei den infizierten Mono-Kulturen hingegen ab der mittleren EC-Konzentration (4,01 nM) leicht bis mittlere jeweilige Effekte. Demgegenüber zeigten sich die entsprechenden Ko-Kulturen weniger sensitiv für Bortezomib. Lediglich die höchste EC-Konzentration (6,11 nM (EC₉₀)) führte

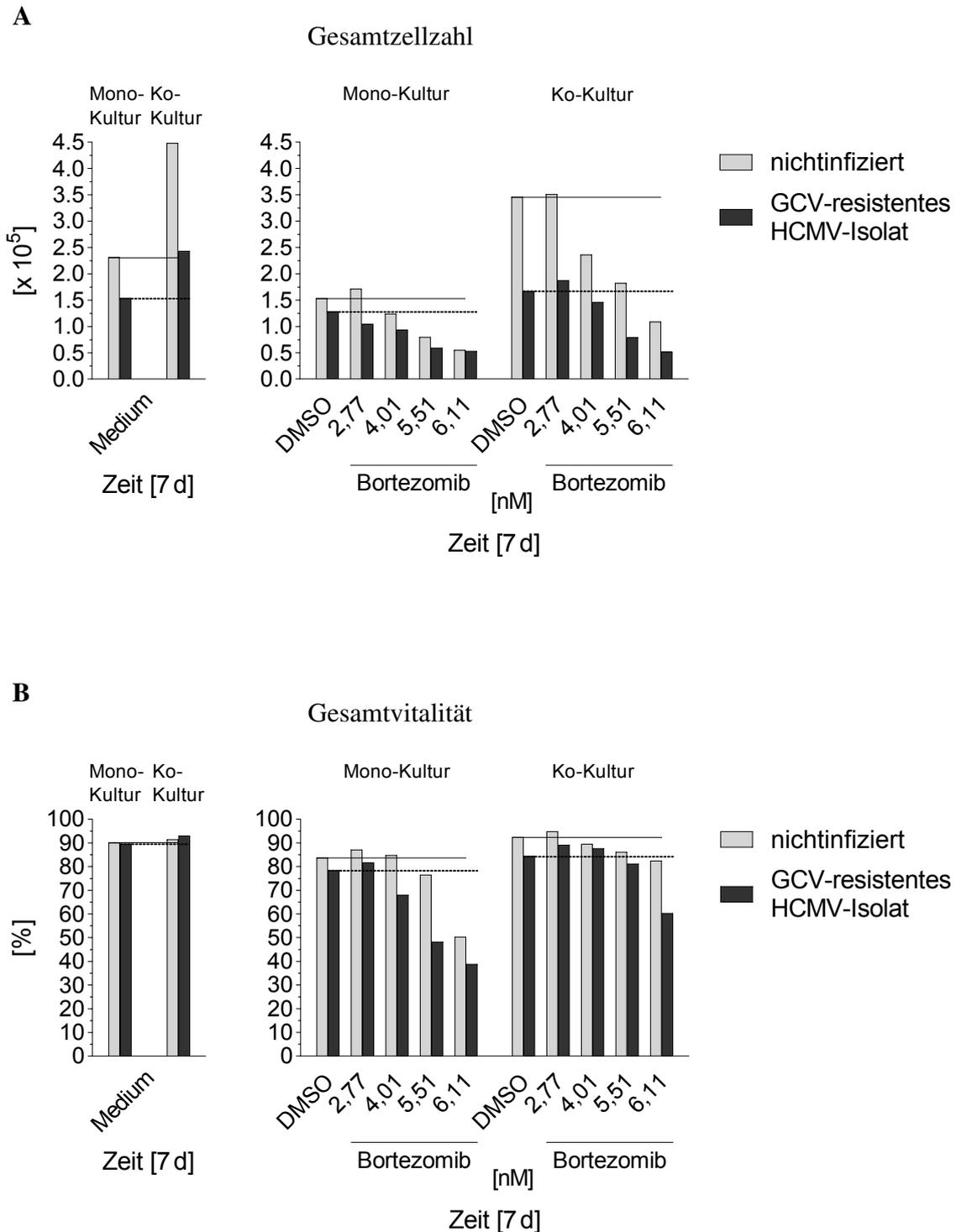


Abb. 6.16 Proliferations- und Vitalitätseffekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2-Mono-Kulturen und Ko-Kulturen bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium und Bortezomib

Nach 7-tägiger Inkubation nichtinfizierter und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierter Caco-2-Mono- und Ko-Kulturen mit 2% (*v/v*) FCS-EMEM, Bortezomib (2,77 nM (EC₃₅); 4,01 nM (EC₅₀); 5,51 nM (EC₇₅); 6,11 nM (EC₉₀)) sowie dem Lösungsmittel DMSO erfolgte mithilfe des Trypanblau-Ausschlusstests die Überprüfung der Proliferation und Vitalität. **A** stellt die Gesamtzellzahl [$\times 10^5$], links nach Inkubation der jeweiligen Kulturen mit Medium sowie rechts mit Bortezomib und dem Lösungsmittel, dar. **B** zeigt dementsprechend die Gesamtvitalität [%]. Die DMSO-Konzentration entsprach 6,11 nM Bortezomib. In den linken Graphen kennzeichnet die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten Medium-Kontrolle der Caco-2-Mono-Kultur und die durchbrochene Linie die der Medium-behandelten infizierten Mono-Kultur. In den rechten Graphen stellt die durchgezogene Linie die Höhe der Werte der nichtinfizierten und die durchbrochene Linie die der infizierten Lösungsmittel-Kontrolle dar. In A und B sind die Ergebnisse von einem Experiment repräsentiert.

bei der infizierten Ko-Kultur zu einem leicht verminderten Effekt (s. Abb. 6.16 B, rechts).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse möglicherweise, dass die nichtinfizierte Ko-Kultur der Caco-2 mit Fibroblasten, bei 7-tägiger serumarmer Medium-Behandlung, einen starken proliferativen Effekt gegenüber der Mono-Kultur induzierte. Der leichte antiproliferative Einfluss von HCMV bei der Mono-Kultur wurde durch die Ko-Kultur ebenso verstärkt. Der durch Bortezomib mit Konzentrationsanstieg initiierte hohe antiproliferative Effekt mit einer gleichermaßen verminderten Zellvitalität war bei der nichtinfizierten wie infizierten Mono-Kultur nachweislich. Sowohl bei der nichtinfizierten als auch bei der infizierten Ko-Kultur zeigte sich ein ebensolcher Trend, die Zellvitalität war jedoch lediglich bei der infizierten Ko-Kultur leicht vermindert.

7 Diskussion

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den häufigsten malignen Tumoren Deutschlands. Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) gibt für das Jahr 2014 eine standardisierte Erkrankungsrate¹ für Frauen mit 35,7 (Prognose für 2018: 32,8) und für Männer mit 54,0 (Prognose für 2018: 50,6) sowie eine standardisierte Sterberate¹ entsprechend mit 12,8 und 21,0 an [1]. Im Jahr 2014 war das KRK die zweithäufigste Tumorlokalisation aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern sowie die dritthäufigste Tumorlokalisation aller Krebssterbefälle bei beiden Geschlechtern [2]. Weltweit werden einer Schätzung zufolge im Jahr 2018 über 1,8 Millionen neue Karzinomfälle und 881 000 Todesfälle auftreten. Die Inzidenz ist der deutschen Rangfolge für das Jahr 2014 entsprechend. Hinsichtlich der Mortalität liegt das KRK bei Frauen an zweiter und bei Männern an dritter Stelle [3]. Eine Assoziation zwischen dem KRK und dem Humanen Cytomegalievirus (HCMV), welche Huang und Roche (1978) zuerst vermuteten [118], ist seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung mit ambivalenter Studienlage. Molekulare Mechanismen, auf die der Zusammenhang basiert, sind nicht vollständig geklärt [118–120, 122, 128, 129]. Weiterhin zeigen Studien jüngerer Zeit für HCMV, dass die Inhibition der Proteasomaktivität durch den Proteasominhibitor MG132 die Hemmung der Virusreplikation bei den Fibroblasten zur Folge hat [149, 191]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst analysiert, ob die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 permissiv für HCMV ist. Darüber hinaus erfolgten Untersuchungen zum Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf die HCMV-Replikation bei den Caco-2. Zudem kamen Experimente zur Prüfung des Apoptose/Nekrose-Verhaltens nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei unterschiedlichen Expositionszeiten von serumarmen Medium und Bortezomib zur Anwendung. Effekte der HCMV-Infektion wurden bei der Ko-Kultur (Caco-2 mit Fibroblasten gemischt) und der Ko-Infektion (Caco-2 mit HCMV-infizierten Fibroblasten gemischt) des Weiteren vergleichend überprüft. Bei den nichtinfizierten und infizierten Ko-Kulturen wurde daneben das Apoptose/Nekrose- und Proliferationsverhalten bei längerer Anwesenheit von HCMV und/oder Bortezomib untersucht.

7.1 Diskussion der Methoden

7.1.1 Etablierte Methoden

7.1.1.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der Caco-2 bei Gegenwart von Medium unterschiedlicher FCS-Konzentrationen, HCMV und/oder Bortezomib sowie von Fibroblasten erfolgten unter

¹je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung

Verwendung des Trypanblau-Ausschlusstests (s. 5.1.3). Dieses Verfahren gilt als Gold-Standard für die Bestimmung der vitalen und avitalen Zellen aufgrund seiner einfachen Handhabbarkeit und Zugänglichkeit [192]. Weitere Vorteile resultieren aus der morphologischen Begutachtung der Zellen durch den mikroskopischen Blick sowie der kostengünstigen Methodik. Hinsichtlich der individuellen Bestimmung der Zellvitalität erfolgte eine definierte Durchführung des Tests. Weiterhin wurde vor der Zellzählung das entsprechende Zellsediment, nach dem Dekantieren des Zellüberstandes, in serumfreies Kulturmedium aufgenommen. Damit soll sowohl der durch das PBS verminderten Vitalität als auch der durch die Bindung des Farbstoffes an Serumproteine verfälschten Ergebnisse entgegengewirkt werden. Vorteile automatisierter Zählverfahren ergeben sich neben der einfachen Handhabbarkeit und dem kostengünstigen Verfahren aus der Möglichkeit der Messung aus einer hohen Gesamtzellzahl sowie der direkten Bestimmung kleinerer Zellzahlen, wobei die Reduzierung der Vitalität der Scherspannung während des Messens sowie der Aufbewahrung der Zellen in PBS über die Zeit zuzuschreiben ist [160, 192]. Morphologische Unterschiede der Zellen können ebenfalls die automatisierte Messung beeinflussen. Zelldebris ist mit beiden Methoden zu evaluieren. Die objektive Bestimmung der Zellzahl und daraus folgend der Zellvitalität bleibt dennoch schwer.

7.1.1.2 Plaquereduktionsassay

Um die Genauigkeit des Plaquereduktionsassays, der die Konzentration infektiöser Partikel einer Probe angibt, zu erhöhen, erfolgte die Überschichtung der Zellen nach der Infektion mit dem Methylcellulose-Kulturmedium (s. 5.1.6). Das Polymer Methylcellulose verhindert die Zellinfektion über das Medium mit Ausbildung von sekundären Plaques, so dass nur Nachbarzellen direkt infiziert werden [193]. Die Kerne HCMV-infizierter Zellen konnten durch das chromogene Substrat AEC im Anschluss an die Inkubation mit dem gegen HCMV-IE1/IE2 gerichteten Primärantikörper und einem HRP-konjugierten Anti-Maus-Sekundärantikörper visualisiert werden. Die Plaques wurden unter Verwendung eines Lichtmikroskops detektiert.

7.1.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Für den qualitativen Nachweis der Expression viraler Proteine bei den Caco-2 wurde die indirekte Immunfluoreszenz in Anlehnung an Weller und Coons (1954) [194], als eine der häufigsten verwendeten Methoden in der Immunzytochemie, gewählt (s. 5.4.1). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der direkten Immunfluoreszenz ergibt sich aus der Nutzung zweier Antikörper. Der Primärantikörper, der gleichzeitig als sekundäres Antigen fungiert und gegen ein Fluorochrom-Konjugat gerichtet ist, kann infolgedessen in geringeren Mengen eingesetzt werden. Für eine hohe spezifische Fluores-

zenz wurden in dieser Arbeit ein Fluorochrom-konjugiertes F(ab')₂-Antikörperfragment sowie ein voradsorbierter Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt [178, 195].

7.1.1.4 PicoGreen[®]-Assay

Mithilfe von PicoGreen[®]-Reagenz besteht die Möglichkeit, freie dsDNA zu quantifizieren (s. 5.2.1). Anhand dieses Verfahrens wurde das Ausmaß der Nekrose nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 in Gegenwart von serumarmen Medium und den Proteasominhibitoren der entsprechenden Zellkulturüberstände vergleichend analysiert. Die Durchführung des Tests erfolgte in Anlehnung an Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen[™]). Der Vorteil des hochempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen[®] besteht darin, dass dieser vorzugsweise in dsDNA interkaliert mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor > 1 000 und somit kleine Mengen an DNA erfasst und quantifiziert. Der Farbstoff ist gegenüber Bindungen an ko-extrahierte Substanzen resistent. Hintergrundstörungen durch RNA sind nicht ausgeschlossen [172, 173].

7.1.1.5 Kommerzielle Tests

Die im Methodenteil vorgestellten kommerziellen Tests zur vergleichenden Überprüfung zeitabhängiger apoptotischer oder zytotoxischer Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei Anwesenheit von serumarmen Medium sowie den Proteasominhibitoren wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt bzw. nach Absprache modifiziert. Die Auswahl der Testverfahren richtete sich nach dem Anspruch einer etablierten quantitativen Methode mit hoher Empfindlichkeit, Spezifität, Reproduzierbarkeit sowie Effizienz, bei der die Ergebnisse durch zusätzliche Verfahren verifiziert, spezifiziert oder ergänzt werden können.

Cell Proliferation Kit II (XTT)

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Proteasominhibitoren bei den nichtinfizierten Caco-2 erfolgte mittels Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics GmbH) (s. 5.1.7). Scudiero *et al.* (1988) beschrieben erstmalig mit Anwendung des löslichen XTT einen nichtradioaktiven, effizienten sowie hinsichtlich toxischer Lösungsmittel sicheren Assay bei Überlegenheit gegenüber dem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-Assay [196]. Der Hersteller verweist auf Jost *et al.* (1992) hinsichtlich einer nichtradioaktiven Alternative zu dem [⁵¹Cr]-Release-Zytotoxizitätstest. Die Sensitivität des XTT-Assays ist derjenigen des radioaktiven Assays entsprechend. Der XTT-Assay weist jedoch eine signifikante niedrigere Inter- und Intra-Test-Variabilität sowie einen niedrigeren Hintergrund auf, insbesondere nach Langzeitinkubation [197]. Hinweise deuten darauf, dass Veränderungen der Zellkulturumgebungen wie die Glukosezufuhr oder der pH-Wert des Mediums die Reduktion von Tetrazoliumsalzen beeinflussen können [198].

Durchflusszytometrie

Das Verfahren der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie, entwickelt von Dittrich und Göhde (1968) [199], wurde genutzt, um virale Proteine (s. 5.5.1) sowie apoptotische/nekrotische Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 bei Anwesenheit von serumarmen Medium und den Proteasominhibitoren zeitabhängig zu analysieren (s. 5.5.2). Das BD FACSCalibur™-System bietet dabei die Möglichkeit virale Proteine wie auch frühapoptotische, spätapoptotische/nekrotische und vitale Zellen, durch Verwendung von spezifischen Fluorochromen [200], zu separieren und zu detektieren. Die Vorteile des Verfahrens umfassen die Schnelligkeit der Analyse sowie die Objektivität und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse [185, 186]. Als nachteilig erweist sich die kostenintensive Anschaffung, die sich durch die Arbeitsgruppen-übergreifende Nutzung relativiert, welches auch für die zur Auswertung der Daten benutzte Software zutrifft.

JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit

Die Veränderung des $\Delta\Psi_M$, analysiert durch den Membran-permeierenden JC-1-Farbstoff (Cayman Chemical Company) [170, 171] (s. 5.1.8), charakterisiert eines der sehr frühen Ereignisse in der Apoptose-Kaskade [168] mit Porenbildung in der Mitochondrienmembran und Freisetzung von Cytochrom c sowie weiterer Proteine aus dem Innenmembranraum in das Cytosol [169]. In Abhängigkeit vom elektrochemischen Gradienten kann der Farbstoff als Aggregat oder Monomer vorliegen. Durchflusszytometrische Experimente ergaben, dass JC-1 im Vergleich zu den Farbstoffen Rhodamin132 (R132) und *3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide* (DiOC₆(3)) zuverlässiger für die Analyse von $\Delta\Psi_M$ -Veränderungen war, während die anderen Farbstoffe eine niedrigere Sensitivität (R123) oder ein nichtkohärentes Verhalten aufgrund einer hohen Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen des Plasmamembranpotentials (DiOC₆(3)) zeigten [170, 201]. Für die Fluoreszenz-Analyse sowie Ratio-Berechnung kam ein Mikroplattenleser zur Anwendung. Dieses Verfahren erwies sich im Hinblick auf die Durchflusszytometrie insofern überlegen, als dass die zur Infektion eingesetzten Virussuspensionsvolumina sowie Verbrauchsmaterialien erheblich reduziert werden konnten.

Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Dem Hersteller zufolge basiert der oben erwähnte ELISA (Roche Diagnostics GmbH) (s. 5.4.2) auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Nutzung von monoklonalen Maus-Antikörpern, die gegen DNA bzw. Histone gerichtet sind. Dadurch wird die spezifische Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten, in dieser Arbeit untersucht, ermöglicht. Die Spezifität des Tests ist durch die Verwendung des Anti-Histon-Biotin-Antikörpers, der an die Histone H1, H2A, H2B, H3 sowie H4 verschiedener Spezies

bindet, und des Anti-DNA-POD-Antikörpers, der mit ein- und doppelsträngiger DNA reagiert, gegeben [181].

7.1.1.6 Statistische Anwendung

Die Auswahl der Stichprobe war in dem zu untersuchenden Merkmal begründet. Diesbezüglich erfolgte der Vergleich der HCMV-Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 (Behandlungsgruppe) mit den nichtinfizierten Zellen (Kontrollgruppe). Anti- oder proapoptotische und jeweils nekrotische sowie antivirale Effekte, die durch HCMV und/oder dem Agens Bortezomib induziert werden könnten, wurden gleichfalls verglichen. Verfälschungen von Ergebnissen durch einen möglichen Einfluss der Lösungsmittel der Agenzien konnten durch deren Mitführung bei den Experimenten eliminiert werden. Die Zuhilfenahme der Zelllinie HELF Fi301, des Proteasominhibitors (S)-MG132, des Apoptose-Kontrollagens Staurosporin sowie der entsprechenden Negativ- oder Test-Positiv-Kontrolle sollte die Validität der Experimente gewährleisten. Die korrekte Durchführung der Methoden unterstützte die Vermeidung von systematischen Fehlern. Die Anwendung etablierter Methoden und kommerzieller Tests konnten die Wahrscheinlichkeit, dass das zu untersuchende Merkmal auch wirklich bestimmt wird, untermauern. Die Reliabilität wurde durch die Wiederholung der Methode geprüft. Um signifikante Unterschiede zwischen den gegenübergestellten Gruppen zu prüfen, kam die Durchführung des ungepaarten, zweiseitigen t-Tests nach *Student* mit den gewonnenen Daten zum Einsatz [202].

7.1.2 Etablierung von Grundlagen für verschiedene Methoden

7.1.2.1 Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat

Hinsichtlich der Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat konnten Jarvis *et al.* (1999) am Tag 8 nach Infektion der Zellen mit dem HCMV-Stamm Towne anhand der Expression von IE2-86 zeigen, dass für eine maximale HCMV-Infektion frühere Stadien der Zelldifferenzierung (*transepithelial resistance* (TER): $\leq 250 \Omega \times \text{cm}^2$; ungefähr 40 % IE2-86-positive Zellen) geeigneter sind als spätere (TER: $350 \Omega \times \text{cm}^2$; 1,8 % IE2-86-positive Zellen) und somit die Infektion vom Differenzierungszustand der Caco-2 abhängig sei [203]. Esclatine *et al.* (2000), welche die Zellen mit dem Laborstamm AD169 infizierten, widerlegten dies mit der Argumentation, dass die Infektion der Caco-2 möglicherweise mit dem verwendeten HCMV-Laborstamm zusammenhängt. Laborstämme weisen im Vergleich zu klinischen Isolaten Deletionen in ihren viralen Genomen auf [151]. Zudem berichteten die Autoren, dass die HCMV-Infektion überwiegend an der basolateralen Zellmembran polarisierter Caco-2 erfolgt [151, 203].

Esclatine *et al.* (2000) konnten des Weiteren darstellen, dass die Vorbehandlung des Monolayers mit EGTA die HCMV-Infektion der Caco-2 erhöht, da der Ca^{2+} -Chelator die *Zonulae occludentes* (*tight junctions*) von polarisierten Zellen trennt (s. Abb. 5.1), untersucht durch Pitelka *et al.* (1983) [166], und somit der laterale Pol der Zellen freilegt wird [151]. Jarvis *et al.* (1999) diskutieren dazu, dass der Verlust der *tight junctions* zu einer Reorganisation von intrazellulären Komponenten wie Aktin und Mikrotubuli führt, welche für den gezielten Transport der in die Zelle eintretenden Virionen zum Zellkern erforderlich sein könnten [203].

Anzumerken sei, dass hinsichtlich der lateralen Ausbreitung der Nachkommenviren von Zelle zu Zelle bei polarisierten Epithelzellen Unterschiede bestehen. Bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 erfolgte im Vergleich zu der humanen *adult retinal pigment epithelial* (ARPE)-19-Zelllinie keine Ausbreitung der Nachkommenviren von Zelle zu Zelle. ARPE-19, eine nichtimmortalisierte Zelllinie mit begrenzter Passage, war bis zu den Studien mit der Zelllinie Caco-2 die einzige charakterisierte Epithelzelllinie, von der bekannt war, dass sie für eine HCMV-Infektion permissiv ist [203]. Weiterhin scheinen Unterschiede in Bezug auf die Produktion von Nachkommenviren bei der Zelllinie Caco-2 mit den verwendeten HCMV-Stämmen zusammenzuhängen. Jarvis *et al.* (1999) zeigten, dass eine basolaterale Infektion der Caco-2 mit dem Towne-Stamm (MOI = 25) produktiv ist, wobei es lediglich bei einem Bruchteil der infizierten Zellen zu einer produktiven Infektion kam (> 20 d p. i.). Die Nachkommenviren sind intrazellulär lokalisiert und werden aus der apikalen Membrandomäne freigesetzt [203]. Demgegenüber konnten Esclatine *et al.* (2000) nach Infektion der Caco-2 mit dem HCMV-Laborstamm AD169 (MOI = 0,2; 1; 2) keine produktive Virusinfektion nachweisen, weder bei früheren noch späteren Stadien der Zelldifferenzierung (2-24 d p. i.) [151].

In dieser Arbeit erfolgte für die experimentelle HCMV-Infektion die Verwendung definierter Zellzahlen im Gegensatz zu der oben erwähnten direkten basolateralen oder TER-abhängigen Infektion. Für die Einstellung der Zellzahlen wurde, entsprechend dem Proliferationsverhalten der Caco-2 (s. Anhang, Abb. 9.1 A), die anfänglich verminderte Proliferation berücksichtigt, so dass nach 48 h eine Konfluenz von ca. 85–90 % vorlag. Darüber hinaus erfolgte im Anschluss für 24 h die Zellkultivierung in Gegenwart von 1 % (v/v) FCS-EMEM, um eine Zellzyklus-Synchronisation zu erreichen [165]. Unter Einbeziehung aufgeführter Erkenntnisse kamen für eine verbesserte Infektion die Behandlung der Caco-2 mit EGTA für 1 h sowie die Verwendung einer hohen MOI (30), in Anlehnung an Jarvis *et al.* (1999), welche die Zellen, wie vorgenannt, mit dem HCMV-Stamm Towne sowie HCMV-*green fluorescent protein* (GFP)-Toledo (Stamm HV5.111) mit einer MOI von 25 basolateral erfolgreich infizierten [203], zur Anwendung. Um die Virusadsorption zu verbessern, wurden die Zellen während der Infektionszeit zusätzlich für 45 min sedimentiert (1 215 x g) [151].

Der Nachweis sehr früher (IE1, IE2) viraler Proteine, des frühen (pUL44) sowie des späten

(pp28) viralen Proteins erfolgte qualitativ unter Anwendung der indirekten Immunfluoreszenz (IE1, pUL44, pp28) sowie quantitativ anhand des Plaquereduktionsassays (IE1/IE2) (s. 7.2.1) und der Durchflusszytometrie (IE1/IE2, pp28) (s. 7.1.2.2).

7.1.2.2 Quantitative Analyse viraler Proteine der HCMV-infizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mittels Durchflusszytometrie

Die Etablierung der durchflusszytometrischen Quantifizierung der sehr frühen viralen Proteine IE1/IE2 (s. Abb. 6.1 B) und des späten viralen Tegumentproteins pp28 bei 7-tägiger Gegenwart von serumarmen Medium (s. Abb. 6.1 C) erfolgte modifiziert nach Wiebusch und Hagemeyer (2014) [187] gemäß dem Protokoll zur Analyse der Zellzyklus-abhängigen HCMV-Gen-Expression (s. 5.5.1). Das Thymidin-Analogon *5-Ethynyl-2'-deoxyuridine* (EdU) und die Click-Chemie werden dabei genutzt, um HCMV-nichtpermissive S-Phasenzellen auf schonende Weise zu markieren. Dadurch wird ermöglicht, diese Zellen in späteren Phasen des viralen Replikationszyklus zu identifizieren und ihre Gegebenheit in Bezug auf IE, frühe und späte Proteinexpressionen zu verfolgen. Da sich in dieser Arbeit die Quantifizierung viraler Proteine auf eine Zellzyklus-unabhängige Expression, als erste Übersichtsdetektion, beschränkte, kam es nicht zu deren Anwendungen. Um eine kostengünstige Methode zu gewährleisten, wurde zusätzlich auf die Click-Chemie verzichtet. Weitere Modifikationen beinhalten die 20-minütige Fixierung sowie die Resuspendierung der Tumorzellen unter Nutzung von Einkanalpipetten mit den entsprechenden Pipettenspitzen bzw. das Austesten verschiedener Primärantikörper mit den jeweiligen Titrationen. Der angegebene Inkubationszeitraum der Zellen mit den spezifischen Antikörpern von 30–60 min wurde exakt auf 60 min eingestellt. Da zur Sicherheit eine höhere Ausgangsgesamtzellzahl ($2-3 \times 10^6$) für die Untersuchung vorbereitet war, erfolgte deren Aufnahme in 150 μ l PBS anstatt in 100 μ l. Die Verwendung eines Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpers, dem Protokoll entsprechend, sollte eine hohe Empfindlichkeit und Fluoreszenzspezifität gewährleisten. Durchflusszytometrisch kamen je Probenansatz 1×10^5 Zellen (als 100 % definiert) zur Analyse.

Anhand der oben beschriebenen Methode erfolgte zudem die Überprüfung der Expression von pp28 bei den nichtinfizierten und infizierten Caco-2 nach 7-tägiger Behandlung mit der EC₇₅-Konzentration von Bortezomib (5,51 nM) sowie (S)-MG132 (157 nM). Für (R)-MG132 wurde dieselbe EC₇₅-Konzentration eingesetzt wie für (S)-MG132. Die Abbildung 7.1 zeigt, ebenso wie die Abbildung 6.1 C, die signifikante gering höhere pp28-Expression infizierter Caco-2 (infizierte Medium-Kontrolle), bei serumarmer Medium-Behandlung, gegenüber derjenigen der nichtinfizierten Zellen (nichtinfizierte Medium-Kontrolle). Für Bortezomib wie auch (S)-MG132 konnte bei den infizierten Caco-2 kein signifikanter Nachweis der pp28-Expression sowohl im Vergleich zu der nichtinfizier-

ten Medium-Kontrolle als auch zu den entsprechend behandelten nichtinfizierten Zellen erbracht werden. (R)-MG132, welches im Rahmen der EC_{50} -Bestimmung zu keiner Plaquereduktion führte (s. Anhang, Abb. 9.2 C, D), zeigte jedoch einen gering höheren Effekt. Weiterhin lag ein gering verminderter Effekt für Bortezomib sowie (S)-MG132 bei den infizierten Caco-2 im Vergleich zu

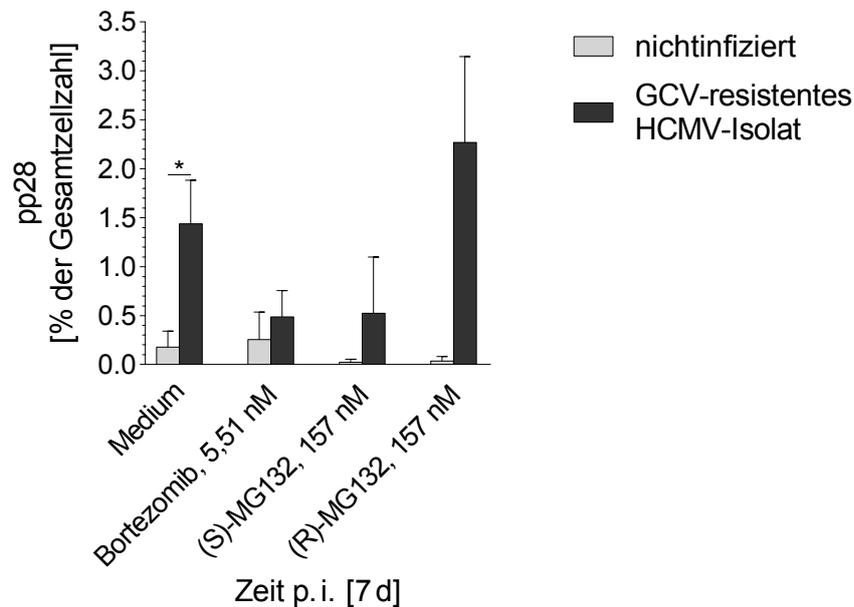


Abb. 7.1 Quantitativer Nachweis des viralen Proteins pp28 der HCMV-infizierten Caco-2 bei Anwesenheit verschiedener Proteasominhibitoren

Nach 7 d p.i. wurden die mit serumarmen Medium, Bortezomib (5,51 nM (EC_{75})) sowie (S)-MG132 (157 nM (EC_{75})) und (R)-MG132 (dieselbe EC_{75} -Konzentration wie (S)-MG132) behandelten nichtinfizierten sowie HCMV-infizierten (MOI=30) Caco-2 fixiert und anschließend mit dem Primärantikörper CMV pp28 (5C3) sowie dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper Anti-Maus/Alexa Fluor 488 inkubiert. Unter Nutzung des BD FACSCalibur™ erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung des späten Tegumentproteins pp28. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten für Bortezomib sowie von zwei unabhängigen Experimenten für (S)-MG132 und (R)-MG132. Medium-Kontrolle s. ebenso Abb. 6.1 C.

der infizierten Medium-Kontrolle vor, (R)-MG132 zeigte einen gegensätzlichen Trend (s. Abb. 7.1). Die Ergebnisse, sowohl für Bortezomib als auch für (S)-MG132, wurden bezüglich der quantifizierten relativ niedrigen pp28-Expressionsrate der Medium-behandelten infizierten Caco-2 gegenüber derjenigen der nichtinfizierten Medium-Kontrolle durch die indirekte Immunfluoreszenz überprüft. Für die jeweilige EC_{75} -Konzentration konnte bei den infizierten Caco-2 im Vergleich zu der infizierten Medium-Kontrolle (s. Anhang, Abb. 9.5 A; C) keine Expression von pp28 nachgewiesen werden (s. Anhang, Abb. 9.5 A; I, O), die entsprechende EC_{50} -Konzentration führte jedoch zu einer geringen Expression (s. Anhang, Abb. 9.5 A; F, L). Gegenüber der Kontrolle akkumulierte zudem pUL44 bei Präsenz beider EC -Konzentrationen in kleineren bis punktförmigen Prä-Replikationszentren (s. Anhang, Abb. 9.5 A; E, H, K, N). Weiterhin war die Anzahl IE1/IE2-positiver Zellen verringert (s. Anhang, Abb. 9.5 A; D, G, J, M). Die Medium-behandelten infizierten HELF Fi301 zeigten die

jeweiligen viralen Proteine erwartungsgemäß (s. Anhang, Abb. 9.5 A; P, Q, R). Die nichtinfizierten entsprechend behandelten Zelllinien sind im Anhang, Abbildung 9.5 B, zu sehen.

Zusammenfassend schienen hinsichtlich der Ergebnisse die etablierten Grundlagen geeignet zu sein, um quantitativ durchflusszytometrisch die Expression viraler Proteine bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 nachweisen zu können. Es ist anzumerken, dass bei den mit dem spezifischen Primärantikörper CMV pp28 (5C3) gegen das virale späte Tegumentprotein pp28 inkubierten Caco-2 durchflusszytometrisch Autofluoreszenzen analysiert wurden, welches zu einer inkorrekten Ergebnisinterpretation führen könnte. Die Austestung von Antikörpern, eine hohe Probenanzahl sowie die Bestimmung der Nachweisgrenze wären u. a. zu empfehlen, um die Methodik zu optimieren.

7.1.2.3 Erleichterte Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat durch primäre Fibroblasten

Im Gegensatz zu den Vorbehandlungen der Caco-2 (s. 7.1.2.1) für die HCMV-Infektion mithilfe einer Virussuspension kamen für die Etablierung der erleichterten Infektion durch die Ko-Infektion mit primären HCMV-infizierten Fibroblasten frisch geerntete sowie nichtvorbehandelte Caco-2 konventioneller Kultivierung zum Einsatz. Hinsichtlich des Nachweises viraler Proteine durch ein entsprechendes Messverfahren und Herausarbeiten eines Effektes erfolgte die Mischung von Caco-2 mit infizierten Fibroblasten in einem Verhältnis von 2 : 1. Gleichmaßen wurden Caco-2 mit nichtinfizierten Fibroblasten gemischt (Ko-Kultur). Um die Infektionsrate mittels Expressionsrate von IE1/IE2 der Ko-Kultur optimal überprüfen zu können, wurden die Caco-2-Mono-Kultur (Kontrolle) wie auch die Ko-Kultur mit einer Virussuspension niedrigen Titer (MOI = 30) infiziert. Die Ernte HCMV-infizierter Fibroblasten für die Ko-Infektion erfolgte gerade bei einem CPE von 100 %, wobei zu diesem Zeitpunkt die Mono- wie auch die Ko-Kultur in Parallelansätzen für deren gleichzeitige Infektion vorbereitet sein mussten. Durch das prozentuale Verhältnis der quantifizierten Gesamtplaques der Ko-Kultur sowie Ko-Infektion zu denjenigen der Mono-Kultur, unter Nutzung des Plaquereduktionsassays, konnte die jeweilige Rate der Gesamtinfektion ermittelt werden. Die Verwendung definierter Gesamtzellzahlen erlaubte durch lichtmikroskopische Schätzung der Gesamtkonfluenz erste indirekte Aussagen zum Gesamtproliferationsverhalten der Ko-Infektion (s. 7.2.5).

Eine initiale Prüfung der Reliabilität der angewendeten Methoden erfolgte durch Messwiederholungen. Insgesamt wurde die zu dieser Zeit aktuellste Software für die Analyse von durchflusszytometrischen Daten sowie für die statistische Auswertung genutzt.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 ist permissiv für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat

Die Permissivität der Caco-2 für HCMV, als Voraussetzung für die Untersuchungen zum Apoptose/Nekrose-Verhalten bei Anwesenheit von HCMV und/oder Bortezomib, konnte gezeigt werden. Qualitativ mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde die Expression des viralen sehr frühen (IE1), des frühen (Prozessivitätsfaktor pUL44) sowie des späten (Tegumentprotein pp28) Proteins nach 7 d p. i. nachgewiesen (s. Abb. 6.1 A). Für den Vergleich und die indirekte Bestätigung der sehr stark höheren Plaqueanzahlen Proteasominhibitor-unbehandelter infizierter Caco-2, verglichen mit den entsprechenden nichtinfizierten Zellen mittels Plaquereduktionsassays im Rahmen der EC_{50} -Bestimmungen (s. Anhang, Abb. 9.2), sowie für die Bestätigung der Expression von pp28 anhand der indirekten Immunfluoreszenz (s. Abb. 6.1 A; H, I) erfolgten die durchflusszytometrischen Quantifizierungen von IE1/IE2 und pp28. Die nachgewiesene hohe Infektionsrate mittels IE1/IE2-Expressionsrate (rund 71 %) infizierter Caco-2 (s. Abb. 6.1 B) verifizierte das Ergebnis der oben erwähnten Methode. Benz *et al.* (2001) ermittelten durch die Immunfluoreszenz 72 h nach Infektion des subkonfluenten Caco-2-Monolayers mit dem HCMV-Laborstamm AD169 (MOI = 10; Sedimentation bei 800 x g, 30 min) mehr als 60 % IE1-72-positive Zellen [165]. Der quantitative Nachweis der Expression von pp28 (1,3 %) bei den infizierten Caco-2 (s. Abb. 6.1 C) war ebenso mit dem Ergebnis der vorgenannten Methode zu vereinbaren. Eine durchflusszytometrische Analyse nach Inkubation infizierter Caco-2 mit dem monoklonalen Mausantikörper CMV gB (1-M-12) ergab eine Expressionsrate des Glykoproteins gB, die um ungefähr 6,7 % erhöht war gegenüber derjenigen der nichtinfizierten Zellen (n = 1, Graph nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte der Nachweis der Permissivität der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 für das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat erbracht werden.

7.2.2 Inhibitorischer Effekt von Bortezomib auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Jüngere Studien konnten für HCMV zeigen, dass die Inhibition der Proteasomaktivität durch den Proteasominhibitor MG132 die Hemmung der Virusreplikation bei den Fibroblasten zur Folge hat [149, 191]. Um einen antiviralen Effekt von Bortezomib sowie (S)-MG132 gegen das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 zu untersuchen, wurde zunächst mithilfe von Plaquereduktionsassays die 50%ige effektive Konzentration (EC_{50}), bei welche die Virusreplikation um 50 % gegenüber der Proteasominhibitor-unbehandelten infizierten

Kontrolle (als 100 % definiert) reduziert ist, nach 7 d p. i. bestimmt. Sowohl für Bortezomib als auch für (S)-MG132 konnte durch Reduktion der Anzahl von Plaques der Nachweis erbracht werden, dass mit steigender Konzentration die HCMV-Replikation verringert wird (s. Anhang, Abb. 9.2 A, B). Der anti-HCMV-Effekt der Proteasominhibitoren entspricht den Beobachtungen für MG132 durch Kaspari *et al.* (2008) bei den mit dem HCMV-Laborstamm AD169 infizierten Fibroblasten [149]. Interessanterweise erwies sich Bortezomib sehr stark effektiver (rund 25 Mal) gegenüber (S)-MG132 (s. Tab. 6.1). Die Ergebnisse zeigten, dass die Proteasominhibitoren bei der Kolonkarzinomzelllinie ebenso, wie bei der Fibroblastenzelllinie, Einfluss auf die HCMV-Infektion nehmen können. Ursächlich kann dies einerseits auf die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) beruhen, andererseits könnten zudem zytotoxische Nebeneffekte involviert sein, die durch Proteasominhibitoren initiiert werden. Der ermittelte CC_{50} -Wert für Bortezomib war stark vermindert (um ungefähr 2/3) gegenüber dem Wert für die EC_{50} , für (S)-MG132 ließen sich annähernd identische Werte bestimmen (s. Tab. 6.1). Damit war der Selektivitätsindex (SI)-Wert für (S)-MG132 bei der Karzinomzelllinie stark vermindert (um rund 5/6) im Vergleich zu demjenigen bei der Nichtkarzinomzelllinie [149]. Die gewonnenen Ergebnisse können mit den Ergebnissen präklinischer Studien von Crawford *et al.* (2011), dass maligne Zellen, verglichen mit normalen Zellen, anfälliger für zytotoxische Effekte der Proteasomhemmung sind, vereinbart werden. Die Mechanismen hinter der höheren Sensitivität von malignen Zellen sind jedoch unklar. Wahrscheinlich nutzen sie das Proteasom, um Proliferation und antiapoptotische Wege zu regulieren. Da die meisten Karzinomzellen stark proliferativ sind und demzufolge einen erhöhten Proteinsynthesebedarf haben, könnte dies zu einer höheren Anfälligkeit für eine Proteasominhibition führen [147].

Zusammenfassend verdeutlichten die Ergebnisse, dass der inhibitorische Effekt des Proteasominhibitors Bortezomib auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 vermutlich auf zytotoxische Nebeneffekte beruhte.

7.2.3 HCMV induziert zeitabhängig proapoptotische sowie antiapoptotische Effekte bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

In der Literatur wurde in den letzten Jahrzehnten anhand von experimentellen Studien für HCMV, bei persistierender Infektion [204], eine onkomodulierende Wirkung diskutiert. Als Tumor-Promotor scheint HCMV wahrscheinlich eine Rolle bei der Pathogenese einiger humaner Tumore (Prostatakarzinom, Hodgkin-Lymphom (insbesondere bei Epstein-Barr-Virus-negativen Fällen), malignes Gliom) [205–207], wie auch beim KRK [117], zu spielen. *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimente lassen vermuten, dass die durch HCMV induzierte Regulation von Transkriptionsfaktoren mit Blockierung der Apoptose, Dysregulation zellulärer DNA-Reparatur-Mechanismen, Hochregula-

tion der Expression des VEGF, Verstärkung des Zellwachstums und der Zellzyklusprogression, Hemmung der Aktivität von Tumorsuppressorproteinen oder DNA-Mutationen für das Entstehen von Malignitäten von Relevanz sein könnten sowie die Tumorprogression verstärken und/oder fördern [208–212]. Demgegenüber zeigten entsprechende Studien jüngerer Zeit einen durch HCMV induzierten proapoptotischen Effekt. Die Apoptose war dabei assoziiert mit einer Reduktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 sowie verstärkter Spaltung der apoptotischen Proteine Caspase-3, Caspase-9 sowie Caspase-8 [213–215].

In dieser Arbeit zeigten die Ergebnisse der Untersuchungen zum Apoptose/Nekrose-Verhalten der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 bei Anwesenheit des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats, dass nach 12-stündiger Behandlung der infizierten Zellen mit serumarmen Medium HCMV zu einem mittleren verminderten Effekt bezüglich der Rate der JC-1-Fluoreszenz-Ratio (J-Monomere / J-Aggregate) gegenüber der nichtinfizierten Medium-Kontrolle führte. Dieser war ebenso nach 24 h sowie 7 d nachweisbar (s. Abb. 6.8 A, 6.3 A). Durchflusszytometrisch konnte für HCMV nach der 4-stündigen entsprechenden Zellbehandlung ein geringer profrühapoptotischer wie prospätaoptotischer/pronekrotischer Effekt, verglichen mit der Kontrolle, analysiert werden (s. Abb. 6.7). Ab 12 h sowie nach 7 d war ein gleichermaßen gegenteiliger Trend erkennbar (s. Abb. 6.6; 6.2, links). Im Vergleich dazu induzierte serumarmes Medium bei den nichtinfizierten Caco-2 einen leichten, im Untersuchungszeitraum zunehmenden, prospätaoptotischen/pronekrotischen Effekt. Die Raten Histon-assoziiierter DNA-Fragmente sowie dsDNA-Konzentrationen unterstützten die für HCMV oben dargestellte Tendenz (s. Abb. 6.9 A, 6.10 A, 6.4 A). Bezüglich einer tumorigenen Wirkung von HCMV zeigten Harkins *et al.* (2002), dass die Infektion (HCMV-Stamm Towne, MOI = 1) nach 48 h p. i. in eine erhöhte Expression von COX-2 und des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 bei den Caco-2, die IE1-72 exprimierten, gegenüber den nichtinfizierten benachbarten Zellen oder *mock* resultierte, welches ein Fortschreiten der Tumorprogression durch Förderung der Angiogenese und Tumorzellinvasion impliziert [117]. Die konstante, über 50%ige Verminderung der Rate der JC-1-Fluoreszenz-Ratio lässt eine Stabilisation des $\Delta\Psi_M$ vermuten und stützt somit indirekt das oben erwähnte Ergebnis für Bcl-2. Residierendes Bcl-2 schützt die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und zeigt *in vivo* bei Überexpression onkogenes Potential durch Suppression der Apoptose. An dieser Stelle sei anzumerken, dass neben der Kernhülle und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) [216] der residierende Ort von Bcl-2 in der Mitochondrienmembran kontrovers diskutiert wird [169].

Hinsichtlich antiapoptotischer Mechanismen von HCMV zeigten die Ergebnisse von Yu und Alwine (2002) nach Experimenten mit der temperatur-sensitiven *baby hamster kidney* (BHK-21 *ts13, fibroblast cells*)-Zelllinie *in vitro*, dass die HCMV-*major immediate-early proteins* (MIEPs)

IE1-72 und IE2-86 über die Stimulierung des *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-Signalweges die zelluläre Kinase Akt (Proteinkinase B) aktivieren, wodurch die Apoptose gehemmt wird. Da beide Proteine 85 identische Aminosäuren am N-Terminus besitzen, besteht die Möglichkeit, dass diese Region die Apoptose-Inhibitionsfunktion vermittelt. Der Akt-Signalweg wurde ursprünglich als wichtiger Regulator der Glukoseaufnahme und des Metabolismus untersucht, der durch Insulin, *Insulin-like growth factors* (IGF) und andere Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Interessanterweise ist der Akt-Signalweg zusätzlich ein allgemeiner Vermittler des Zellüberlebens. Sobald die Akt aktiviert ist, kann es eine Reihe von Faktoren wie zum Beispiel *Bcl-2 antagonist of cell death* (Bad) oder Caspase 9 phosphorylieren, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten [217]. Damit lässt sich ein Zusammenhang zu den Studien von Itoh *et al.* (2002) vermuten. Deren Ergebnisse deuten nach Untersuchungen von 65 Gewebeproben (von Patienten mit KRK) und zwei Kolonkarzinomzelllinien, dass die Aktivierung der Akt eine Rolle bei der Progression des KRK spielt, indem die Zellproliferation gefördert und die Apoptose inhibiert wird [218]. An einem *In-vivo*-Experiment konnten Bongers *et al.* (2010) demonstrieren, dass HCMV-Genprodukte wie der *cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28* in der Lage sind, den PI3K/Akt- sowie den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu aktivieren. Die Stimulierungen sind mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert, die über die Entwicklung von hyperplastischem Darmepithel in ein Adenokarzinom mündet [219].

Für die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 konnten, bezüglich einer Tumorzell-Virus-Interaktion, zum Beispiel Zhirnov und Klenk (2003) mit der Influenza A-vermittelten Apoptose-Resistenz einen möglichen Mechanismus darstellen, welcher nach Infektion der Zellen keine Apoptose sondern Nekrose induziert. Dabei fiel auf, dass ein sichtbarer CPE erst nach 42–45 h p. i. auftrat mit einem 10–30%igen Anteil avitaler Zellen, der nach 70 h p. i. 60–80 % betrug. Im Gegensatz dazu lag die Rate avitaler Zellen der *Madin-Darby canine kidney* (MDCK, *epithelial cells*)- und *African green monkey kidney fibroblast cells* (CV-1)-Zelllinie schon frühzeitig nach 20–22 h p. i. bei 80–90 %. Betreffend die Dominanz nekrotischer Marker vermuten die Autoren, dass die Nekrose auf eine insuffiziente oder verzögerte Signalisierung der Caspase-Aktivierung basiert [220]. Guix *et al.* (2004), die den Nachweis einer 70%igen Apoptose, Caspase 8-abhängig, der mit dem Astrovirus mit einer MOI von 5 infizierten Caco-2 nach 72 h p. i. erbrachten, erklärten die unvollständige Apoptose mit einer Abhängigkeit von verschiedenen Virusreplikationsstadien verbunden mit einer zu geringen Menge an Apoptose-induzierenden Virusproteinen sowie die Induktion viraler apoptotischer Inhibitoren. Das komplizierte Gleichgewicht zwischen den viralen sowie zellulären proapoptotischen und antiapoptotischen Stimuli kann intrazellulär über Tod oder Überleben der Zelle entscheiden, wobei der Differenzierungszustand der Caco-2 von Bedeutung ist. Eine Vielzahl von Viren, DNA- wie RNA-Viren, haben Strategien entwickelt, die es ihnen erlauben, in Abhängigkeit von ihrem

Replikationszyklus, Apoptose sowohl zu induzieren als auch zu inhibieren [221].

Zusammenfassend konnte aus den Ergebnissen der Experimente geschlussfolgert werden, dass das GCV-resistente klinische HCMV-Isolat bei zunehmender unveränderter Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit serumarmen Medium einen geringen antiapoptotischen Effekt bewirkte, wobei vermutlich frühzeitig das mitochondriale Membranpotential stabilisiert wurde.

7.2.4 Bortezomib induziert zeitabhängig antiapoptotische sowie proapoptotische Effekte bei der HCMV-infizierten und nichtinfizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Mithilfe zahlreicher experimenteller Studien konnte nachgewiesen werden, dass der potente und selektive Proteasominhibitor Bortezomib bei unterschiedlichen Tumorzelllinienmodellen und Xenograft-Mausmodellen, ebenso beim Kolonkarzinomzelllinie (LoVo)-Xenograft-Mausmodell, antiproliferativ und proapoptotisch über die Stabilisierung von CDK-Inhibitoren sowie des Tumorsuppressorproteins p53, des NF- κ B-Inhibitors I κ B α oder des proapoptotischen Proteins Bax wirkt. Durch die dabei aktivierte JNK kann die Apoptose-Kaskade einleitet werden [134, 137, 147, 222].

In dieser Arbeit wurde der apoptotische Einfluss von Bortezomib sowohl bei der nichtinfizierten als auch bei der HCMV-infizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 untersucht. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass Bortezomib in dem Untersuchungszeitraum (12 h, 24 h, 7 d) bei den infizierten Zellen im Vergleich zu der jeweiligen infizierten Kontrolle keine proapoptotische Wirkung in Form einer Veränderung des $\Delta\Psi_M$ zeigte. Gegenüber der nichtinfizierten Kontrolle als auch den entsprechend behandelten nichtinfizierten Caco-2 lagen zudem geringe bis starke inhibitorische Effekte vor (s. Abb. 6.8 B, 6.3 B). Ein ebensolcher Trend, wobei die antiapoptotischen Effekte geringer waren, konnte anhand der Durchflusszytometrie (s. Abb. 6.7, 6.6; 6.2, rechts) sowie den Raten Histon-assoziiierter DNA-Fragmente (s. Abb. 6.9 B, 6.4 B) analysiert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Proteasomaktivität für die HCMV-Replikation bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 relevant war. Bortezomib, das laut Kisselev und Goldberg (2001) bevorzugt die CT-L Proteasomaktivität hemmt [134], wird in seiner für nichtinfizierte Zellen proapoptotischen Wirkung, die Inhibition der Degradation polyubiquitinerter Proteine, durch HCMV blockiert. Die Ergebnisse von Tran *et al.* (2010) sowie Kaspari *et al.* (2008), welche eine Erforderlichkeit der Proteasomaktivität für die Replikation von HCMV bei Fibroblasten, nach Untersuchungen mithilfe von Proteasominhibitoren (MG132, Lactacystin), zeigten, erlauben eine Übereinstimmung [149, 223].

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der oben erwähnten Experimente für Bortezomib, bei zunehmender Expositionsdauer, einen leichten antiapoptotischen Effekt bei den nichtinfizierten Caco-2. Zugleich war sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Zellen bei längerer

Gegenwart von Bortezomib von einem zytotoxischen Einfluss auszugehen. Die durchflusszytometrisch detektierte leicht höhere Rate später Apoptose/Nekrose bei den nichtinfizierten und marginal bei den infizierten Caco-2 sowie die durch den Trypanblau-Ausschlusstest nachgewiesene mittlere Verminderung der Zellvitalität bei beiden Zellgruppen gegenüber derjenigen der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle ließen dies deuten (s. Abb. 6.2 B, C, rechts; 6.16 B, rechts). Die Effekte der Proteasomhemmung, protektiv, proapoptotisch oder zytotoxisch, sind nach Kozuch *et al.* (2008), Meiners *et al.* (2008) sowie Borissenko und Groll (2007) möglicherweise Tumorzellzyklus- und Tumorzelltyp-spezifisch, mit dem entsprechenden Proliferationsstatus und Differenzierungsgrad, bzw. von der Dosis und der Expositionszeit der Proteasominhibitoren sowie von der Metastasierung abhängig [138, 224, 225]. Längere Expositionen der Proteasominhibitoren können laut Kisselev *et al.* (2001) auf eine Vielzahl von Zellen zytotoxisch wirken [134]. Die Autoren (2006) erreichten beispielsweise hinsichtlich der Zelltyp- und Substratprotein-Spezifität durch Untersuchungen der HeLa-Zelllinie eine nur 11–50%ige Reduktion des proteasomalen Abbaus der entsprechenden Substratproteine durch eine kurzzeitige selektive Inhibition der CT-L Aktivität. Da die Caspase- und Trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms nur in einem geringen Ausmaß oder kaum gehemmt wird [134], war durch die partielle Inhibition des Proteasoms die zytotoxische Wirkung von Bortezomib auch bei hohen Konzentrationen eingeschränkt [226]. Demgegenüber sind bei Myelomzellen vermutlich insbesondere die NF- κ B-abhängige Proliferation sowie die hohe und kontinuierliche Produktionsrate an falsch gefalteten Proteinen, *defective ribosomal products* (DRiPs), für die Wirkung von Bortezomib entscheidend. Die Akkumulation der Proteinlast im ER und im Zytoplasma triggert infolge des ER-Stresses die Induktion von Apoptose-Signalwegen [226, 227]. Dieser Erfolg erbrachte dem Peptid-Boronat Bortezomib die klinische Zulassung initial zur Behandlung von Patienten mit rezidivierenden und refraktären Multiplen Myelom, die mindestens zwei Therapien erhalten haben und mit einer Krankheitsprogression auf die letzte Therapie reagierten [137].

Bei den Untersuchungen fiel auf, dass die Zellen, Passage-abhängig, nach Aussaat für die Experimente teilweise unterschiedlich schnell proliferierten, trotz gleichbleibender Zellkulturbedingungen. Bei der beschleunigten Proliferation der Caco-2 war das vereinzelte Auftreten von Domen (s. Abb. 4.1 C) lichtmikroskopisch sichtbar gegenüber der verzögerten Proliferation. Das nachgewiesene unterschiedliche Proliferationsverhalten (s. Anhang, Abb. 9.1 A; Abb. 6.5 A) und daraus resultierend der entsprechende Differenzierungszustand der Caco-2 könnten für den Einfluss von serumarmen Medium und den Proteasominhibitoren bedeutsam sein. Die teilweise hohen Standardabweichungen (s. Abb. 6.6 A, B) sowie der leichte Unterschied zwischen der Rate später Apoptose/Nekrose der durchflusszytometrischen Analyse (s. Abb. 6.2 B, links) und der Rate der

Gesamtvitalität, bestimmt anhand des Trypanblau-Ausschlusstests (s. Abb. 6.16 B, links), deuteten nach 7-tägiger Behandlung nichtinfizierter Caco-2 mit serumarmen Medium darauf hin.

Zusammenfassend ließ sich aus den Untersuchungen schlussfolgern, dass Bortezomib, mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen, sowohl bei der nichtinfizierten als auch bei der infizierten Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 bei zunehmender Expositionszeit einen leichten anti-apoptotischen sowie gleichermaßen zytotoxischen Effekt induzierte. Die Wirkung von Bortezomib auf sehr frühe Stadien der Apoptose-Kaskade wurde durch HCMV stabil blockiert. Somit schien die Proteasomaktivität für die Replikation von HCMV bei den Caco-2 von Relevanz zu sein. Zudem könnte die Wirkung von Bortezomib bei den nichtinfizierten sowie infizierten Caco-2 vom Proliferationsverhalten sowie dem Differenzierungszustand beeinflusst werden.

7.2.5 Die Ko-Kultur der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 mit Fibroblasten induziert verminderte proapoptotische Effekte

Das Tumorstroma von Kolonneoplasien besteht zu über 60 % aus unterschiedlich aktivierten Fibroblasten bzw. Myofibroblasten in Syncytium mit Immunzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Epithelzellen und Endothelzellen, die über parakrine Signale und der EZM mit den Tumorzellen agieren [31]. Der Einfluss von Fibroblasten scheint bei der Karzinogenese entscheidend zu sein. Einerseits kontrollieren sie im normalen Intestinalgewebe den Turnover der Epithelzellen, andererseits können sie, TGF- β -vermittelt, als aktivierte Myofibroblasten und CAFs die kolorektale Karzinogenese, Progression und Malignität beeinflussen [30, 31, 33].

In dieser Arbeit wurden zunächst Effekte der HCMV-Infektion bei der Ko-Kultur (Caco-2 mit Fibroblasten gemischt) und der Ko-Infektion (Caco-2 mit HCMV-infizierten Fibroblasten gemischt (s. 7.1.2.3)) überprüft. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zum Einfluss längerer Expositionszeiten (7 d) von HCMV, bei unveränderter serumarmer Medium-Behandlung, und/oder Bortezomib auf das Apoptose/Nekrose-Verhalten sowie auf die Proliferation der Ko-Kultur.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten für die Ko-Kultur sowie Ko-Infektion signifikante stark höhere Gesamtinfektionsraten mittels IE1/IE2-Gesamtexpressionsraten gegenüber derjenigen der Caco-2-Mono-Kultur (s. Abb. 6.12). Zudem demonstriert die Abbildung 6.13, dass die Ko-Infektion, möglicherweise in Abhängigkeit von der Zellzahl und dem HCMV-Titer, entweder zu einer erhöhten Proliferation und Infektion der Zellen (s. Abb. 6.13 D, E) oder zu einer ausgeprägten Zerstörung des Zellmonolayers führte, im Sinne eines CPE (s. Abb. 6.13 A, B), welcher ab der 12. Stunde p. i. lichtmikroskopisch ersichtlich war. Jarvis *et al.* (1999) konnten bei den Caco-2 einen CPE, ab dem 12. Tag p. i. beginnend, durch Abnahme des TER und Vorhandensein von Löchern im Zellmonolayer anhand der Immunfluoreszenz beobachten. Die Zellen wurden jedoch, wie bereits

erwähnt, basolateral mit dem HCMV-Stamm Towne (MOI = 25) infiziert [203].

Die Permissivität der Ko-Kultur für HCMV wurde anhand der Western-Blot-Analyse mit dem Nachweis des viralen sehr frühen (IE1), des frühen (pUL44) sowie des späten (pp28) Proteins nach 7 d p. i. gezeigt (s. Abb. 6.14; Spur 9, 4). Für HCMV ergaben die Experimente mit einer gering verminderten Gesamtexpression von Bax durch die Western-Blot-Analyse (s. Abb. 6.14; Spur 9, 4) sowie der gleichermaßen verminderten gesamt-frühen Apoptose, durchflusszytometrisch detektiert (s. Abb. 6.15 A, C, links), einen geringen antiapoptotischen Effekt bei der Ko-Kultur im Vergleich zu der nichtinfizierten Ko-Kultur. Darüber hinaus führte HCMV bezüglich der Gesamtzellzahl bei der Ko-Kultur zu einem mittleren verminderten Effekt gegenüber der entsprechenden nichtinfizierten Kultur, bei der Mono-Kultur zu einem leicht verminderten Effekt (s. Abb. 6.16 A, links). Kalejta *et al.* (2003) konnten bei Untersuchungen von Fibroblasten und einer nichtintestinalen epithelialen Zelllinie zeigen, dass das virale Tegumentprotein pp71 den proteasomalen Abbau hypophosphorylierter Proteine der *retinoblastoma (Rb) protein family* induziert und somit die Progression des Zellzyklus stimuliert [228]. Durch die Zellzyklusstimulation sowie den nachfolgenden Arrest an der G1/S-Grenze [229, 230] ist HCMV in der Lage, Funktionen zellulärer Prozesse zu modulieren.

Interessanterweise ließ sich überdies eine stark höhere Gesamtzellzahl bei der nichtinfizierten Ko-Kultur, trotz 7-tägiger serumarmer Medium-Behandlung, vergleichend zu derjenigen der entsprechenden Mono-Kultur nachweisen. Die Raten der Gesamtviitalität waren bei beiden Kulturen annähernd identisch (s. Abb. 6.16 A, B, links). An dieser Stelle sei anzumerken, dass die 7-tägige unveränderte serumarme Medium-Behandlung sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Fibroblasten keine nennenswerten proapoptotischen Effekte gegenüber den jeweiligen Caco-2 zeigte (s. Abb. 7.2).

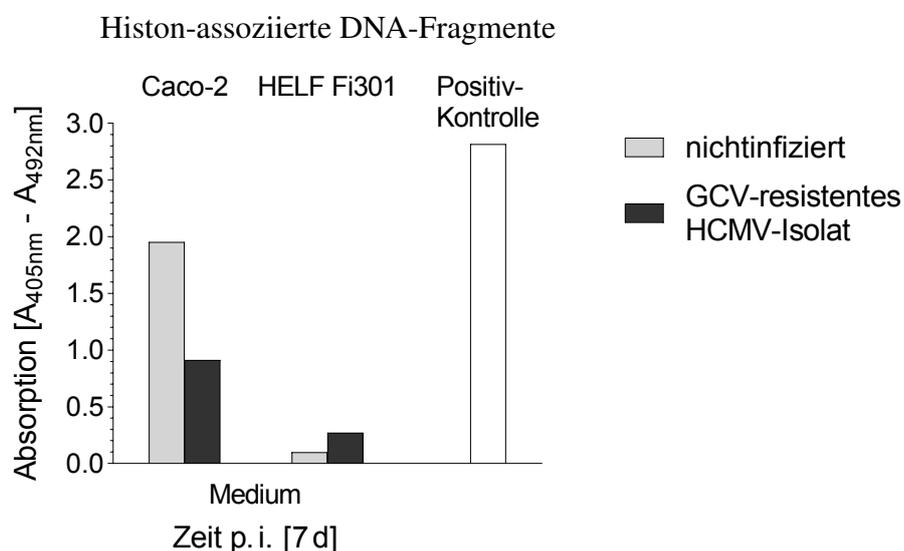


Abb. 7.2 Apoptose-Effekte nichtinfizierter und HCMV-infizierter Caco-2 sowie HELF Fi301 bei längerer Anwesenheit von serumarmen Medium detektiert mittels Cell Death Detection ELISA^{Plus}

Nichtinfizierte und mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 bzw. 1 infizierte Caco-2 sowie HELF Fi301 wurden in Gegenwart von serumarmen Medium für 7 d kultiviert. Anschließend konnten die präsentierten Absorptionen, welche proportional zu den Histon-assoziierten DNA-Fragmenten sind, nach Durchführung des oben erwähnten ELISA am Mikroplattenleser SunriseTM spektrophotometrisch detektiert werden. Die Positiv-Kontrolle entsprach der Firmen-Positiv-Kontrolle. Die Ergebnisse von einem Experiment sind repräsentiert.

Die oben erwähnten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien von Göke *et al.* (1998). Die Autoren konnten nach einer 24-stündigen direkten Ko-Kultivierung nachweisen, dass nichtintestinale Fibroblasten die Proliferation der Caco-2 stimulieren, wenn auch in geringerem Maße im Vergleich zu den intestinalen Fibroblasten, bei denen die Stimulierung über die Sekretion des HGF erfolgt. Die Wirkung von HGF äußert sich in einer Förderung der Proliferation der Darmepithelzellen vornehmlich im Kryptenbereich über den von der Epithelpopulation präsentierten HGF-Rezeptor c-Met [33].

Die Ko-Kultur schien des Weiteren den Einfluss von Bortezomib bei längerer Anwesenheit zu vermindern. Anhand der Western-Blot-Analyse konnte der Nachweis erbracht werden, dass der Proteasominhibitor, bezüglich der Bax-Gesamtexpression, einen konzentrationsabhängigen geringen antiapoptotischen Effekt bei den nichtinfizierten Ko-Kulturen sowie gleichermaßen proapoptotischen Effekt bei den infizierten Ko-Kulturen, verglichen mit der entsprechenden Medium-Kontrolle, induzierte (s. Abb. 6.14; Spur 4-6, 9-11). Durchflusszytometrisch ließ sich bei den nichtinfizierten Ko-Kulturen ein konzentrationsabhängiger marginaler antifrühapoptotischer wie antispätapoptotischer/antinekrotischer Effekt im Vergleich zu der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle analysieren. Bei den infizierten Ko-Kulturen war lediglich ein konzentrationsabhängiger geringer profrühapoptotischer Effekt zu verzeichnen (s. Abb. 6.15 A, B, C, rechts). Leichte antiapoptotische Effekte wurden durch den Trypanblau-Ausschlusstest für die Ko-Kultur im Vergleich zu der Mono-Kultur gezeigt. Allenfalls die EC₉₀-Konzentration von Bortezomib induzierte einen leichten proapoptotischen Effekt bei der infizierten Ko-Kultur gegenüber der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle. Sowohl bei der Mono- als auch bei der Ko-Kultur, nichtinfiziert wie infiziert, wirkte Bortezomib mit Konzentrationsanstieg stark antiproliferativ (s. Abb. 6.16 A, B, rechts). Dass Bortezomib *in vitro* eine Wachstumshemmung bei anderen humanen Kolonkarzinomzelllinien (LOVO, KM12L4, WiDR, CCD841 sowie Colo320HSR, HT29, DLD1), in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionsdauer, induzierte, wurde von Cusack *et al.* (2001) und Hong *et al.* (2012) berichtet [222, 231]. Hong *et al.* (2012) wiesen zudem nach, dass die Antitumoraktivität von Bortezomib auf die Induktion des G2/M-Zellzyklusarrestes beruhte. Dieser steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Produktion von intrazellulären *reactive oxygen species* (ROS), was auf die Inhibierung des Proteasoms zurückzuführen war. DNA-Schäden durch ROS aktivieren den *ataxia telangiectasia*

mutated (ATM)-cell cycle checkpoint kinase 1 (CHK1) Signalweg, welcher eine Schlüsselrolle beim G2/M-Zellzyklusarrest spielt [231]. Demgegenüber konnten Mackay *et al.* (2005) in einer nichtrandomisierten Phase-II-Studie bei metastasierendem Kolorektalkarzinom zeigen, dass Bortezomib als Einzelwirkstoff inaktiv war [232]. In einer folgenden randomisierten Phase-II-Studie stellte Kozuch *et al.* (2008) ebenso die Unwirksamkeit von Bortezomib als Monowirkstoff sowie in Kombination mit dem Zytostatikum Irinotecan bei Patienten mit rezidivierenden bzw. refraktären KRR dar. Die Aktivität von Bortezomib scheint in verschiedenen soliden Tumoren variabel zu sein. Beispielsweise ist dessen Aktivität, insbesondere in Kombinationstherapien, im fortgeschrittenen Androgen-unabhängigen Prostatakarzinom, rezidivierenden Ovarialkarzinom und nichtkleinzellichem Lungenkarzinom höher im Vergleich zu dem metastasierenden Mammakarzinom sowie Melanom und dem Nierenzellkarzinom. Die Gründe für diese variable Aktivität sind nicht bekannt. Diskutiert werden Unterschiede hinsichtlich der Zuverlässigkeit Proteasom-abhängiger Wege sowie der Fähigkeit der Proteasom-Hemmung, um somit den tumortyp-spezifischen Zellzyklus und die antiapoptotischen Mechanismen zu stören. Es ist auch möglich, dass KRR-Metastasen für Bortezomib weniger permeabel sind als andere Tumortypen [224].

Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse, dass die HCMV-Infektion der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 durch die Ko-Kultur mit primären Fibroblasten sowie durch die Ko-Infektion, bei der Karzinomzellen mit HCMV-infizierten Fibroblasten kultiviert werden, erleichtert wurde. Die Ko-Infektion führte, zellzahl- sowie HCMV-titerabhängig, einerseits zu einem frühzeitig ausgeprägten CPE, andererseits war eine hohe Proliferation und Infektion der Caco-2 nachweisbar. Die Ko-Kultur bewirkte, bei 7-tägiger unveränderter serumarmer Medium-Behandlung, einen starken proproliferativen sowie geringen prospäpoptotischen/pronekrotischen Effekt. HCMV induzierte bei der Ko-Kultur, wie bei der Caco-2-Mono-Kultur, einen geringen antifrühapoptotischen Effekt. Der antiproliferative Einfluss von HCMV wurde durch die Ko-Kultur leicht erhöht. Für Bortezomib war, mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen, eine bei Konzentrationsanstieg hohe antiproliferative Aktivität bei der nichtinfizierten wie bei der infizierten Mono- und Ko-Kultur nachweislich. Die bei der Mono-Kultur auftretende hohe proapoptotische Wirkung wurde durch die Ko-Kultur leicht vermindert, sowohl bei den nichtinfizierten als auch bei den infizierten Kulturen. Um den Einfluss von HCMV sowie den Effekt der Ko-Kultur auf die Wirkung von Bortezomib bei dem Kolonkarzinomzelllinien/Fibroblastenzelllinien-Modell zu verifizieren, sollten dreidimensionale (3-D)-Experimente, die der physiologischen Zellumgebung am nächsten sind, unter Berücksichtigung des Zelldifferenzierungszustands, Gegenstand weiterführender Studien sein.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, Berlin; Stand: 06.12.2017. (Accessed January 21, 2018, at https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c18_c21_darm.pdf?__blob=publicationFile).
- [2] Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, Berlin; Stand: 06.12.2017. (Accessed January 21, 2018, at https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile).
- [3] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68:394–424.
- [4] Hamilton S, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA. Tumours of the Colon and Rectum. In: Hamilton S, Aaltonen L, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system.* Lyon: IARC Press; 2000. p. 103-143.
- [5] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL; Stand: August 2014. (Accessed January 4, 2017, at <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>).
- [6] Robert Koch-Institut, Berlin; Stand: 29.11.2017. (Accessed January 21, 2018, at http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf;jsessionid=CC8A18FDA5BB0C5651397C29A4997ACE.1_cid381?__blob=publicationFile).
- [7] World cancer report. Stewart BW, Wild CP, eds. *International Agency for Research on Cancer*; 2014. p. 392-402.
- [8] Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One.* 2013;8:e53916.
- [9] Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett.* 2010 Jul;293:133–143.
- [10] Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138:2044–2058.
- [11] Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009 Oct;4:22.
- [12] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001 Apr;48(4):526–535.
- [13] Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut.* 1994 Jul;35(7):950–954.
- [14] DA Silva FC, Wernhoff P, Dominguez-Barrera C, Dominguez-Valentin M. Update on Hereditary Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2016 Sep;36:4399–4405.

- [15] Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Dtsch Arztebl Int.* 2013 Jan;110:32–38.
- [16] Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009 Jul;76:1–18.
- [17] Kerr SE, Thomas CB, Thibodeau SN, Ferber MJ, Halling KC. APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. *J Mol Diagn.* 2013 Jan;15:31–43.
- [18] Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci.* 2013 Aug;14:16365–16385.
- [19] Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer.* 2005 Nov;104:2035–2047.
- [20] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun;61:759–767.
- [21] Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Oct;107:760–766.
- [22] Nusse R, Stanford University, Stanford; Stand: January 2017. (Accessed March 18, 2017, at http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes).
- [23] Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell.* 2012 Jun;149:1245–1256.
- [24] Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479–507.
- [25] Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jul;9:489–499.
- [26] Orlando FA, Tan D, Baltodano JD, Khoury T, Gibbs JF, Hassid VJ, Ahmed BH, Alrawi SJ. Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. *J Surg Oncol.* 2008 Sep;98:207–213.
- [27] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Blut- und Krebserkrankungen, Kolonkarzinom, Berlin; Stand: Januar 2016. (Accessed January 16, 2017, at <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom/@@view/html/index.html#litID0EHSAl>).
- [28] Sobin LH, Wittekind Ch. *TNM Classification of Malignant Tumors.* 6th ed. New York : Wiley-Liss; 2002.
- [29] Meyer HJ, Wittekind Ch. *TNM Klassifikation maligner Tumoren.* 7th ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell; 2010.
- [30] Koliaraki V, Pallangyo CK, Greten FR, Kollias G. Mesenchymal Cells in Colon Cancer. *Gastroenterology.* 2017 Apr;152:964–979.

- [31] Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jul;289:G2–G7.
- [32] Visco V, Bava FA, d'Alessandro F, Cavallini M, Ziparo V, Torrisi MR. Human colon fibroblasts induce differentiation and proliferation of intestinal epithelial cells through the direct paracrine action of keratinocyte growth factor. *J Cell Physiol*. 2009 Jul;220:204–213.
- [33] Göke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol*. 1998 May;274:G809–G818.
- [34] Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Céspedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangués R, Massagué J, Sancho E, Batlle E. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*. 2012 Nov;22(5):571–584.
- [35] Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron*. 2010 Mar;3:149–166.
- [36] Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12:468–476.
- [37] Vellinga TT, den Uil S, Rinkes IH, Marvin D, Ponsioen B, Alvarez-Varela A, Fatrai S, Scheele C, Zwijnenburg DA, Snippert H, Vermeulen L, Medema JP, Stockmann HB, Koster J, Fijnenman RJ, de Rooij J, Kranenburg O. Collagen-rich stroma in aggressive colon tumors induces mesenchymal gene expression and tumor cell invasion. *Oncogene*. 2016 Oct;35:5263–5271.
- [38] Lotti F, Jarrar AM, Pai RK, Hitomi M, Lathia J, Mace A, Gantt GA, Sukhdeo K, DeVecchio J, Vasanji A, Leahy P, Hjelmeland AB, Kalady MF, Rich JN. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med*. 2013 Dec;210(13):2851–2872.
- [39] Mocarski Jr ES, Shenk T, Griffiths P, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1960-2014.
- [40] Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1992;123(3-4):425–449.
- [41] Dowd JB, Aiello AE, Alley DE. Socioeconomic disparities in the seroprevalence of cytomegalovirus infection in the US population: NHANES III. *Epidemiol Infect*. 2009 Jan;137:58–65.
- [42] Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ*. 1973;49(1):103–106.
- [43] Bello C, Whittle H. Cytomegalovirus infection in Gambian mothers and their babies. *J Clin Pathol*. 1991 May;44(5):366–369.
- [44] Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*. 1990;12 Suppl 7:S701–S710.

- [45] Handsfield HH, Chandler SH, Caine VA, Meyers JD, Corey L, Medeiros E, McDougall JK. Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission. *J Infect Dis.* 1985 Feb;151(2):344–348.
- [46] Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17:253–276.
- [47] Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J.* 1992 Feb;11:93–99.
- [48] Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis.* 1991;13(2):315–329.
- [49] Fowler KB, Pass RF. Cytomegalovirus infection as a cause of hearing loss among children. *Am J Public Health.* 1995 May;85(5):734–735.
- [50] Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.* 1992 Mar;326(10):663–667.
- [51] Britt WJ, Pass RF, Stagno S, Alford CA. Pediatric cytomegalovirus infection. *Transplant Proc.* 1991 Jun;23(3 Suppl 3):115–117.
- [52] Cohen JI, Corey GR. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore).* 1985 Mar;64(2):100–114.
- [53] Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1998 Jun;338(24):1741–1751.
- [54] Evans AS. Infectious mononucleosis and related syndromes. *Am J Med Sci.* 1978;276(3):325–339.
- [55] Jehangir W, Sareen R, Sen S, Raoof N, Yousif A. Acute Confusional State: A Manifestation of Toxoplasma and CMV Co-infection in HIV Patient. *N Am J Med Sci.* 2014 Oct;6:545–548.
- [56] Cheung TW, Teich SA. Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med.* 1999 Mar;66(2):113–124.
- [57] Boeckh M, Bowden R. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation. *Cancer Treat Res.* 1995;76:97–136.
- [58] Balfour HH Jr. Cytomegalovirus: the troll of transplantation. *Arch Intern Med.* 1979 Mar;139(3):279–280.
- [59] Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med.* 1996 Sep;335(10):721–729.
- [60] Curran M, Noble S. Valganciclovir. *Drugs.* 2001;61(8):1145–50 ; discussion 1151–2.
- [61] Hitchcock MJM, Jaffe HS, Martin JC, Stagg RJ. Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antivir Chem Chemother.* 1996;7:115–127.
- [62] Chrisp P, Clissold SP. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs.* 1991 Jan;41(1):104–129.

- [63] Deray G, Martinez F, Katlama C, Levaltier B, Beaufile H, Danis M, Rozenheim M, Baumelou A, Dohin E, Gentilini M, Jacobs C. Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *Am J Nephrol*. 1989;9(4):316–321.
- [64] Mercorelli B, Sinigaglia E, Loregian A, Palù G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol*. 2008;18:177–210.
- [65] Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Apr;12(2):286–297.
- [66] U.S. Food and Drug Administration; Stand: 01.12.2017. (Accessed April 29, 2018, at <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm587123.htm>).
- [67] European Medicines Agency; Stand: 17.01.2018. (Accessed April 29, 2018, at http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/human/medicines/004536/human_med_002200.jsp&mid=WC0b01ac058001d124).
- [68] Merck Sharp & Dohme Limited; Stand: 2018. (Accessed May 12, 2018, at https://www.msd.de/fileadmin/user_upload/default/images/007_Presse/002_Artikel-und-Themen_Bilder/Hintergrund_Management_CMV-Erkrankungen.pdf).
- [69] La Rosa C, Longmate J, Martinez J, Zhou Q, Kaltcheva TI, Tsai W, Drake J, Carroll M, Wussow F, Chiuppesi F, Hardwick N, Dadwal S, Aldoss I, Nakamura R, Zaia JA, Diamond DJ. MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults. *Blood*. 2017 Jan;129:114–125.
- [70] Lilja AE, Mason PW. The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB. *Vaccine*. 2012 Nov;30:6980–6990.
- [71] Wussow F, Chiuppesi F, Martinez J, Campo J, Johnson E, Flechsig C, Newell M, Tran E, Ortiz J, La Rosa C, Herrmann A, Longmate J, Chakraborty R, Barry PA, Diamond DJ. Human cytomegalovirus vaccine based on the envelope gH/gL pentamer complex. *PLoS Pathog*. 2014 Nov;10be:e1004524.
- [72] Mersseman V, Böhm V, Holtappels R, Deegen P, Wolfrum U, Plachter B, Reyda S. Refinement of strategies for the development of a human cytomegalovirus dense body vaccine. *Med Microbiol Immunol*. 2008 Jun;197(2):97–107.
- [73] Buxmann H, Hamprecht K, Meyer-Wittkopf M, Friese K. Primary Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in Pregnancy. *Dtsch Arztebl Int*. 2017 Jan;114:45–52.
- [74] Wright HT Jr, Goodheart CR, Lielausis A. Human Cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology*. 1964 Jul;23:419–424.
- [75] Tomtishen JP 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J*. 2012 Jan;9:22.
- [76] Baxter MK, Gibson W. Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. *J Virol*. 2001 Aug;75(15):6865–6873.
- [77] Meyer HH, Ripalti A, Landini MP, Radsak K, Kern HF, Hensel GM. Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. *J Gen Virol*. 1997 Oct;78 (Pt 10):2621–2631.

- [78] Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, Jahn G. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol.* 2000 Dec;81(Pt 12):3021–3035.
- [79] Child SJ, Hakki M, De Niro KL, Geballe AP. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol.* 2004 Jan;78(1):197–205.
- [80] Browne EP, Shenk T. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep;100(20):11439–11444.
- [81] Winkler M, Schmolke S, Plachter B, Stamminger T. The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the major immediate-early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82). *Scand J Infect Dis Suppl* 99. 1995;p. 8–9.
- [82] Liu B, Stinski MF. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol.* 1992 Jul;66(7):4434–4444.
- [83] Britt WJ, Auger D. Identification of a 65 000 dalton virion envelope protein of human cytomegalovirus. *Virus Res.* 1985 Dec;4(1):31–36.
- [84] Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol.* 2000 Dec;74(24):11881–11892.
- [85] Huber MT, Compton T. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol.* 1998 Oct;72(10):8191–8197.
- [86] Li L, Nelson JA, Britt WJ. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):3090–3097.
- [87] Bogner E. Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol.* 2002;12:115–127.
- [88] Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology.* 1983 Oct;130(1):118–133.
- [89] Sarov I, Abady I. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology.* 1975 Aug;66(2):464–473.
- [90] Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Chee MS, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM, Barell B. The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* 1991;2(1):1–12.
- [91] Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM, Barell BG. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;154:125–169.

- [92] Stinski MF, Thomsen DR, Wathen MW. Structure and Function of the Cytomegalovirus Genome. In: Nahmias AJ, Dowdle WR, Schinazi RF, eds. *The Human Herpesviruses. An Interdisciplinary Perspective*. New York: Elsevier North Holland, Inc.; 1981. p. 72-84.
- [93] Wathen MW, Stinski MF. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol*. 1982 Feb;41(2):462–477.
- [94] Bresnahan WA, Shenk TE. UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec;97(26):14506–14511.
- [95] Meier JL, Stinski MF. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology*. 1996;39:331–342.
- [96] Geballe AP, Leach FS, Mocarski ES. Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. *J Virol*. 1986 Mar;57(3):864–874.
- [97] Mocarski Jr ES, Courcelle CT. Cytomegaloviruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2629-2673.
- [98] Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Michelson S. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med*. 1998 Sep;188(5):855–866.
- [99] Huang ES, Chen ST, Pagano JS. Human cytomegalovirus. I. Purification and characterization of viral DNA. *J Virol*. 1973 Dec;12(6):1473–1481.
- [100] Ahn JH, Jang WJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol*. 1999 Dec;73(12):10458–10471.
- [101] de Bruyn Kops A, Uprichard SL, Chen M, Knipe DM. Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. *Virology*. 1998 Dec;252(1):162–178.
- [102] Kamei H, Ito Y, Onishi Y, Suzuki M, Imai H, Kurata N, Hori T, Tainaka T, Uchida H, Ogura Y. Cytomegalovirus (CMV) Monitoring After Liver Transplantation: Comparison of CMV Pp65 Antigenemia Assay with Real-Time PCR Calibrated to WHO International Standard. *Ann Transplant*. 2016;21:131–136.
- [103] Silva MC, Yu QC, Enquist L, Shenk T. Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol*. 2003 Oct;77:10594–10605.
- [104] Scholz B, Rechter S, Drach JC, Townsend LB, Bogner E. Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Res*. 2003 Mar;31:1426–1433.

- [105] Scheffczik H, Savva CG, Holzenburg A, Kolesnikova L, Bogner E. The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* 2002 Apr;30(7):1695–1703.
- [106] Hwang JS, Bogner E. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J Biol Chem.* 2002 Mar;277:6943–6948.
- [107] Bogner E, Radsak K, Stinski MF. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):2259–2264.
- [108] Tandon R, Mocarski ES, Conway JF. The A, B, Cs of herpesvirus capsids. *Viruses.* 2015 Mar;7:899–914.
- [109] Welch AR, Woods AS, McNally LM, Cotter RJ, Gibson W. A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec;88(23):10792–10796.
- [110] Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9:423–429.
- [111] Sanchez V, Angeletti PC, Engler JA, Britt WJ. Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J Virol.* 1998 Apr;72:3321–3329.
- [112] Radsak K, Kern H, Reis B, Reschke M, Mockenhaupt T, Eickmann M. Human Cytomegalovirus: Aspects of Viral Morphogenesis and of Processing and Transport of Viral Glycoproteins. In: Barbanti-Brodano G, Bendinelli M, Friedman H, eds. *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms.* New York: Plenum Press; 1995. p. 295–312.
- [113] Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol.* 2012 Aug;20:392–401.
- [114] Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, Bogner E, Kern H, Eis-Hübinger A, Reschke M. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol.* 1996;141(3-4):557–572.
- [115] Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* 2002 Feb;76(4):1537–1547.
- [116] Tafvizi F, Fard ZT. Detection of human cytomegalovirus in patients with colorectal cancer by nested-PCR. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(3):1453–1457.
- [117] Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet.* 2002 Nov;360(9345):1557–1563.
- [118] Huang ES, Roche JK. Cytomegalovirus D.N.A. and adenocarcinoma of the colon: Evidence for latent viral infection. *Lancet.* 1978 May;1(8071):957–960.
- [119] Roche JK, Cheung KS, Boldogh I, Huang ES, Lang DJ. Cytomegalovirus: detection in human colonic and circulating mononuclear cells in association with gastrointestinal disease. *Int J Cancer.* 1981 May;27:659–667.

- [120] Hart H, Neill WA, Norval M. Lack of association of cytomegalovirus with adenocarcinoma of the colon. *Gut*. 1982 Jan;23:21–30.
- [121] Galloway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a 'hit-and-run' mechanism. *Nature*. 1983 Mar;302(5903):21–24.
- [122] Rüger R, Fleckenstein B. Cytomegalovirus DNA in colorectal carcinoma tissues. *Klin Wochenschr*. 1985 May;63(9):405–408.
- [123] Knösel T, Schewe C, Dietel M, Petersen I. Cytomegalovirus is not associated with progression and metastasis of colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2004 Aug;211(2):243–247.
- [124] Akintola-Ogunremi O, Luo Q, He TC, Wang HL. Is cytomegalovirus associated with human colorectal tumorigenesis? *Am J Clin Pathol*. 2005 Feb;123(2):244–249.
- [125] Shen Y, Zhu H, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr;94:3341–3345.
- [126] Mariguela VC, Chacha SG, Cunha Ade A, Troncon LE, Zucoloto S, Figueiredo LT. Cytomegalovirus in colorectal cancer and idiopathic ulcerative colitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50:83–87.
- [127] Bender C, Zipeto D, Bidoia C, Costantini S, Zamò A, Menestrina F, Bertazzoni U. Analysis of colorectal cancers for human cytomegalovirus presence. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:6.
- [128] Chen HP, Jiang JK, Chen CY, Chou TY, Chen YC, Chang YT, Lin SF, Chan CH, Yang CY, Lin CH, Lin JK, Cho WL, Chan YJ. Human cytomegalovirus preferentially infects the neoplastic epithelium of colorectal cancer: a quantitative and histological analysis. *J Clin Virol*. 2012 Jul;54(3):240–244.
- [129] Dimberg J, Hong TT, Skarstedt M, Löfgren S, Zar N, Matussek A. Detection of cytomegalovirus DNA in colorectal tissue from Swedish and Vietnamese patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2013 Nov;33(11):4947–4950.
- [130] Chen HP, Jiang JK, Lai PY, Chen CY, Chou TY, Chen YC, Chan CH, Lin SF, Yang CY, Chen CY, Lin CH, Lin JK, Ho DM, Cho WL, Chan YJ. Tumoral presence of human cytomegalovirus is associated with shorter disease-free survival in elderly patients with colorectal cancer and higher levels of intratumoral interleukin-17. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jul;20(7):664–671.
- [131] Chen HP, Jiang JK, Lai PY, Teo WH, Yang CY, Chou TY, Lin CH, Chan YJ. Serological and viraemic status of human cytomegalovirus infection in patients with colorectal cancer is not correlated with viral replication and transcription in tumours. *J Gen Virol*. 2016a Jan;97(1):152–159.
- [132] Chen HP, Jiang JK, Chen CY, Yang CY, Chen YC, Lin CH, Chou TY, Cho WL, Chan YJ. Identification of human cytomegalovirus in tumour tissues of colorectal cancer and its association with the outcome of non-elderly patients. *J Gen Virol*. 2016b Sep;97:2411–2420.
- [133] Bai B, Wang X, Chen E, Zhu H. Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Nov;7:76735–76742.

- [134] Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001 Aug;8(8):739–758.
- [135] Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994 Sep;78(5):761–771.
- [136] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:761–807.
- [137] Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell.* 2004 May;5:417–421.
- [138] Borissenko L, Groll M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev.* 2007 Mar;107:687–717.
- [139] Groll M, Huber R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov;1695(1-3):33–44.
- [140] Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science (New York, NY).* 1995 May;268:726–731.
- [141] Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug;96(18):10403–10408.
- [142] Koguchi Y, Kohno J, Nishio M, Takahashi K, Okuda T, Ohnuki T, Komatsubara S. TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J Antibiot (Tokyo).* 2000 Feb;53(2):105–109.
- [143] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999 Jun;59(11):2615–2622.
- [144] Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998 Feb;8(4):333–338.
- [145] Crawford LJ, Walker B, Ovaa H, Chauhan D, Anderson KC, Morris TC, Irvine AE. Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLLCOCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer Res.* 2006 Jun;66(12):6379–6386.
- [146] Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 1994 Sep;78(5):773–785.
- [147] Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal.* 2011 Jun;5(2):101–110.
- [148] Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer cell international.* 2005 Jun;5:18.

- [149] Kaspari M, Tavalai N, Stamminger T, Zimmermann A, Schilf R, Bogner E. Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. *FEBS Lett.* 2008 Mar;582(5):666–672.
- [150] Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Feb;58:209–214.
- [151] Esclatine A, Lemullois M, Servin AL, Quero AM, Geniteau-Legendre M. Human cytomegalovirus infects Caco-2 intestinal epithelial cells basolaterally regardless of the differentiation state. *J Virol.* 2000 Jan;74(1):513–517.
- [152] Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005 Jan;21(1):1–26.
- [153] Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 1988 Apr;48(7):1936–1942.
- [154] Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell.* 1983;47:323–330.
- [155] Hara A, Hibi T, Yoshioka M, Toda K, Watanabe N, Hayashi A, Iwao Y, Saito H, Watanabe T, Tsuchiya M. Changes of proliferative activity and phenotypes in spontaneous differentiation of a colon cancer cell line. *Jpn J Cancer Res.* 1993 Jun;84(6):625–632.
- [156] Selleck Chemicals, Houston, TX, USA; Stand: 2016. (Accessed December 1, 2016, at <http://file.selleckchem.com/downloads/struct/Bortezomib-Velcade-chemical-structure-S1013.gif>).
- [157] Adipogen AG, Liestal, CH; Stand: 2016. (Accessed December 1, 2016, at <http://www.adipogen.com/ag-cp3-0011/mg-132.html>).
- [158] Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA; Stand: 2016. (Accessed December 1, 2016, at <https://www.caymanchem.com/product/13697/image>).
- [159] Sandstroem B. Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. i. influence of the culture method on cell morphology and growth pattern. *Exp Cell Res.* 1965 Mar;37:552–568.
- [160] Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015 Nov;111:A3.B.1–A3.B.3.
- [161] Lindl T. Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- [162] Bang FB, Levy E, Gey GO. Some observations on host-cell-virus relationships in fowl pox. I. Growth in tissue culture. II. The inclusion produced by the virus on the chick chorio-allantoic membrane. *J Immunol.* 1951 Mar;66:329–345.
- [163] Ellis EL, Delbrück M. The growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 1939 Jan;22(3):365–384.
- [164] Condit RC. Principles of Virology. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 21-51.

- [165] Benz C, Reusch U, Muranyi W, Brune W, Atalay R, Hengel H. Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2001 Sep;82(Pt 9):2061–2070.
- [166] Pitelka DR, Taggart BN, Hamamoto ST. Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture. *J Cell Biol*. 1983 Mar;96(3):613–624.
- [167] Melan MA. Overview of cell fixation and permeabilization. *Methods Mol Biol*. 1994;34:55–66.
- [168] Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol*. 1995 Jul;130:157–167.
- [169] Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jan;2:67–71.
- [170] Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*. 1991 May;30(18):4480–4486.
- [171] Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May;88(9):3671–3675.
- [172] Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding. *Biophys J*. 2010 Nov;99:3010–3019.
- [173] Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem*. 1997 Jul;249(2):228–238.
- [174] Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich; Stand: 2016. (Accessed April 2, 2017, at <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07581.pdf>).
- [175] Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich; Stand: 2016. (Accessed June 18, 2017, at <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-GERMAN.pdf>).
- [176] Raymond S. Acrylamide gel electrophoresis. *Ann N Y Acad Sci*. 1964 Dec;121:350–365.
- [177] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680–685.
- [178] Fritschy JM, Härtig W. Indirect Immunofluorescence of Cultured Cells. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005;p. 184–187.
- [179] Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*. 1985 Aug;33(8):845–853.
- [180] Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta*. 1975 Mar;415(1):29–79.

- [181] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Stand: 2017. (Accessed April 17, 2017, at <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/celldethrobul.pdf>).
- [182] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981 Apr;112(2):195–203.
- [183] Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich; Stand: 2016. (Accessed February 16, 2017, at <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602761-Western-Blotting-Handbook.pdf>).
- [184] Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH. The erasable Western blot. *Anal Biochem.* 1987 Feb;161:89–95.
- [185] BD Biosciences, Heidelberg; Stand: 2016. (Accessed November 24, 2016, at <http://www.bdbiosciences.com/sg/instruments/facscalibur/features/controlsanalysis.jsp>).
- [186] Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science.* 1969 Nov;166:747–749.
- [187] Wiebusch L, Hagemeyer C. Use of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine labelling and flow cytometry to study cell cycle-dependent regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Methods Mol Biol.* 2014;1119:123–132.
- [188] Reichling J. Pflanzliche Vielstoffgemische - eine rationale Option zur Bekämpfung lästiger Viren? *ARS MEDICI thema Phytotherapie.* 2011 März;1:22–26.
- [189] Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995 Jan;80:293–299.
- [190] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993 Aug;74:609–619.
- [191] Prösch S, Priemer C, Höflich C, Liebenthafer C, Babel N, Krüger DH, Volk HD. Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. *Antivir Ther.* 2003 Dec;8(6):555–567.
- [192] Chen A, Leith M, Tu R, Tahim G, Sudra A, Bhargava S. Effects of diluents on cell culture viability measured by automated cell counter. *PLoS One.* 2017;12:e0173375.
- [193] Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology.* 2006 Aug;3:63.
- [194] Weller TH, Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954;86:789–794.
- [195] Geckeler KE, Eckstein H. In: *Bioanalytische und biochemische Labormethoden.* Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 435–438.

- [196] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988 Sep;48:4827–4833.
- [197] Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *J Immunol Methods.* 1992 Mar;147(2):153–165.
- [198] Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 1995 Jun;5:69–84.
- [199] European Patent Organisation; Stand: 2017. (Accessed March 25, 2017, at https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?locale=de_EP&CC=DE&NR=1815352#).
- [200] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Jul;184(1):39–51.
- [201] Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* 1997 Jul;411:77–82.
- [202] Hedderich J, Sachs L. *Angewandte Statistik.* 15th ed. Springer Berlin Heidelberg; 2016.
- [203] Jarvis MA, Wang CE, Meyers HL, Smith PP, Corless CL, Henderson GJ, Vieira J, Britt WJ, Nelson JA. Human cytomegalovirus infection of caco-2 cells occurs at the basolateral membrane and is differentiation state dependent. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4552–4560.
- [204] Cinatl J Jr, Vogel JU, Cinatl J, Weber B, Rabenau H, Novak M, Kornhuber B, Doerr HW. Long-term productive human cytomegalovirus infection of a human neuroblastoma cell line. *Int J Cancer.* 1996 Jan;65:90–96.
- [205] Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol.* 2003 Sep;170(3):998–1002.
- [206] Huang G, Yan Q, Wang Z, Chen X, Zhang X, Guo Y, Li JJ. Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease. *Int J Oncol.* 2002 Jul;21:31–36.
- [207] Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res.* 2002 Jun;62(12):3347–3350.
- [208] Wang T, Qian D, Hu M, Li L, Zhang L, Chen H, Yang R, Wang B. Human cytomegalovirus inhibits apoptosis by regulating the activating transcription factor 5 signaling pathway in human malignant glioma cells. *Oncol Lett.* 2014 Sep;8(3):1051–1057.
- [209] Luo MH, Rosenke K, Czornak K, Fortunato EA. Human cytomegalovirus disrupts both ataxia telangiectasia mutated protein (ATM)- and ATM-Rad3-related kinase-mediated DNA damage responses during lytic infection. *J Virol.* 2007 Feb;81:1934–1950.

- [210] Maussang D, Verzijl D, van Walsum M, Leurs R, Holl J, Pleskoff O, Michel D, van Dongen GA, Smit MJ. Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug;103:13068–13073.
- [211] Hsu CH, Chang MD, Tai KY, Yang YT, Wang PS, Chen CJ, Wang YH, Lee SC, Wu CW, Juan LJ. HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *EMBO J*. 2004 Jun;23(11):2269–2280.
- [212] Shen Y, Zhu H, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate “hit-and-run“ oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr;94:3341–3345.
- [213] Kumar A, Coquard L, Pasquereau S, Russo L, Valmary-Degano S, Borg C, Pothier P, Herbein G. Tumor control by human cytomegalovirus in a murine model of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther Oncolytics*. 2016 Apr;3:16012.
- [214] Chen W, Lin K, Zhang L, Guo G, Sun X, Chen J, Ye L, Ye S, Mao C, Xu J, Zhang L, Jiang L, Shen X, Xue X. The cytomegalovirus protein UL138 induces apoptosis of gastric cancer cells by binding to heat shock protein 70. *Oncotarget*. 2016 Feb;7(5):5630–5645.
- [215] Koldehoff M, Lindemann M, Opalka B, Bauer S, Ross RS, Elmaagacli AH. Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(11):3189–3197.
- [216] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2:647–656.
- [217] Yu Y, Alwine JC. Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositide 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol*. 2002 Apr;76:3731–3738.
- [218] Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 2002 Jun;94:3127–3134.
- [219] Bongers G, Maussang D, Muniz LR, Noriega VM, Fraile-Ramos A, Barker N, Marchesi F, Thirunarayanan N, Vischer HF, Qin L, Mayer L, Harpaz N, Leurs R, Furtado GC, Clevers H, Tortorella D, Smit MJ, Lira SA. The cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes intestinal neoplasia in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2010 Nov;120:3969–3978.
- [220] Zhirnov O, Klenk HD. Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology*. 2003;313(1):198–212.
- [221] Guix S, Bosch A, Ribes E, Dora Martínez L, Pintó RM. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology*. 2004 Feb;319(2):249–261.
- [222] Cusack JC Jr, Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin AS Jr. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res*. 2001 May;61(9):3535–3540.
- [223] Tran K, Mahr JA, Spector DH. Proteasome subunits relocalize during human cytomegalovirus infection, and proteasome activity is necessary for efficient viral gene transcription. *J Virol*. 2010 Mar;84(6):3079–3093.

-
- [224] Kozuch PS, Rocha-Lima CM, Dragovich T, Hochster H, O'Neil BH, Atiq OT, Pipas JM, Ryan DP, Lenz HJ. Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: results from a randomized phase II study. *J Clin Oncol.* 2008 May;26:2320–2326.
- [225] Meiners S, Ludwig A, Stangl V, Stangl K. Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med Res Rev.* 2008 Mar;28:309–327.
- [226] Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem.* 2006 Mar;281:8582–8590.
- [227] Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, Hahn S, Schreiber S, Wilhelm S, Herrmann M, Jäck HM, Voll RE. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* 2007 Feb;67:1783–1792.
- [228] Kalejta RF, Bechtel JT, Shenk T. Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol.* 2003 Mar;23:1885–1895.
- [229] Dittmer D, Mocarski ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol.* 1997 Feb;71:1629–1634.
- [230] Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology.* 1996 Oct;224:150–160.
- [231] Hong YS, Hong SW, Kim SM, Jin DH, Shin JS, Yoon DH, Kim KP, Lee JL, Heo DS, Lee JS, Kim TW. Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *Int J Oncol.* 2012 Jul;41:76–82.
- [232] Mackay H, Hedley D, Major P, Townsley C, Mackenzie M, Vincent M, Degendorfer P, Tsao MS, Nicklee T, Birle D, Wright J, Siu L, Moore M, Oza A. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug;11:5526–5533.

9 Anhang

9.1 Proliferationsanalysen der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301

(s. 5.1.3)

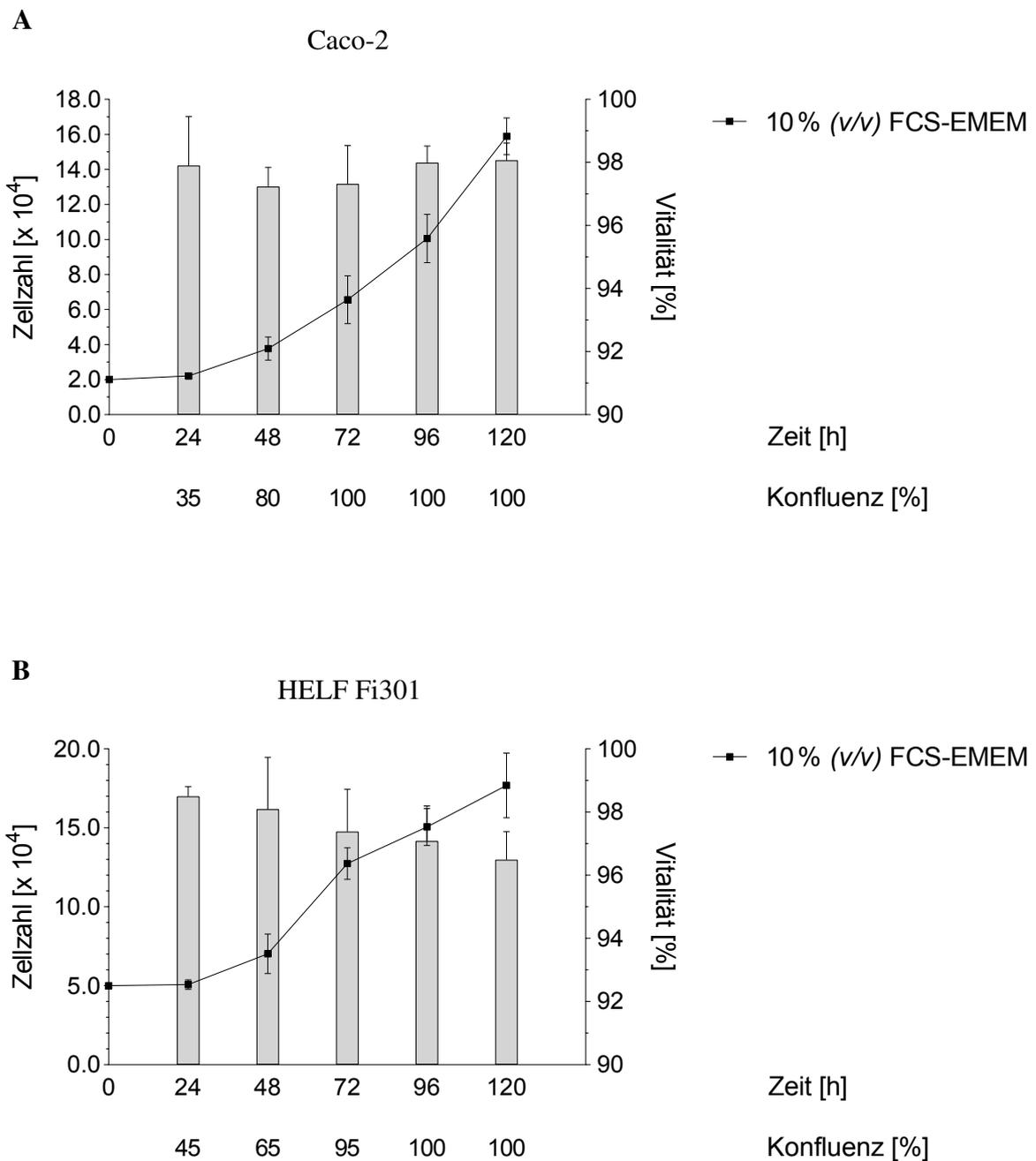


Abb. 9.1 Proliferation und Vitalität der Zelllinien Caco-2 und HELF Fi301

Dargestellt sind die Zellzahlen [$\times 10^4$], Vitalitäten [%] und Konfluenzen [%] in **A** der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 und in **B** der primären Fibroblastenzelllinie HELF Fi301. Die Zellen wurden dazu in definierten Zeiträumen von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h sowie 120 h bei Gegenwart von 10 % (v/v) FCS-EMEM kultiviert. Mittels Trypanblau-Ausschlusstest erfolgte die Bestimmung vitaler und avitaler Zellen zu den vorgenannten Zeitpunkten. Die Konfluenz war jeweils geschätzt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

9.2 Bestimmung der EC_{50} von Bortezomib, (S)-MG132 und (R)-MG132

(s. 5.1.6)

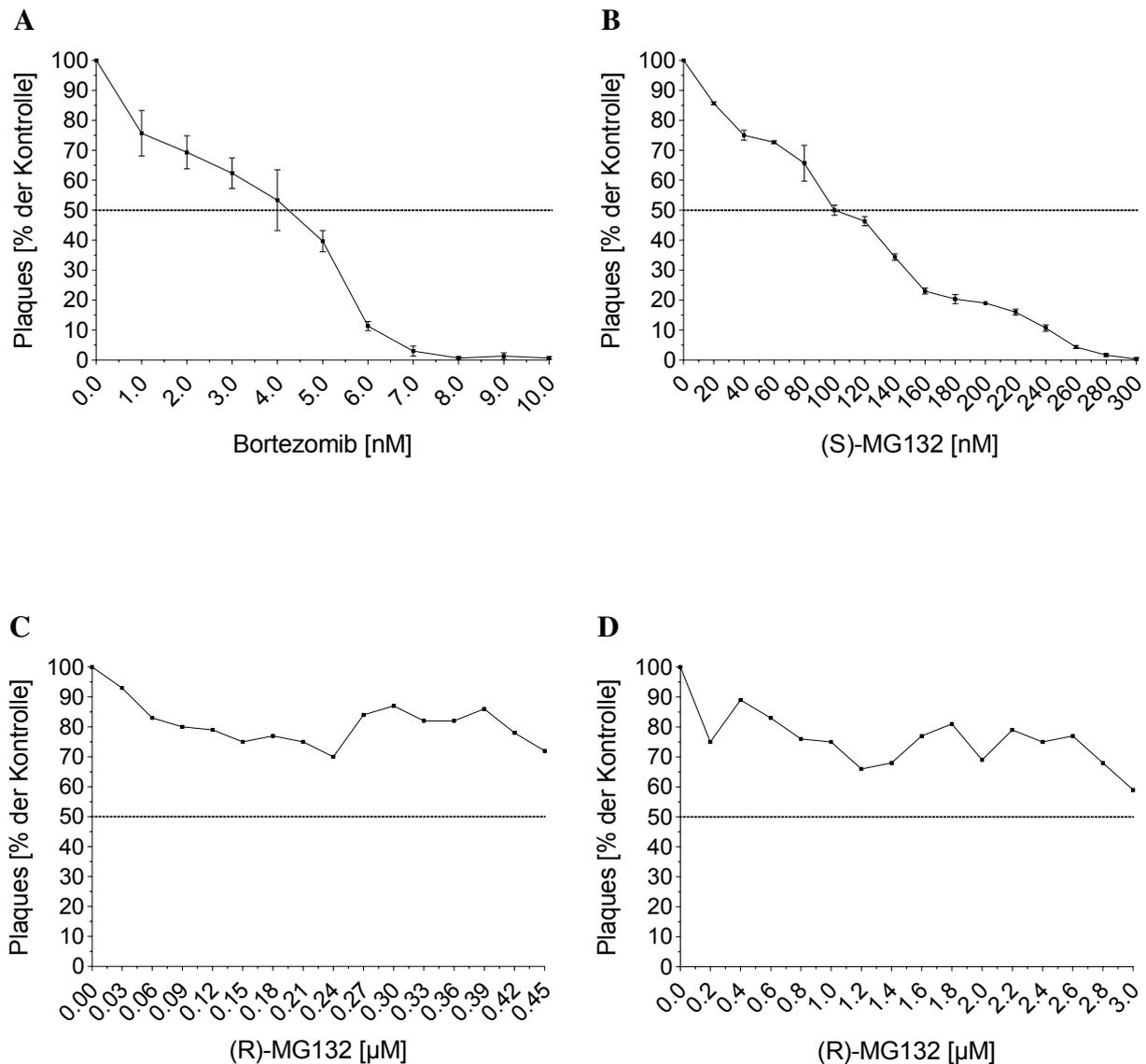


Abb. 9.2 Einfluss von Bortezomib, (S)-MG132 und (R)-MG132 auf die Replikation des GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2

Die mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierten Caco-2 wurden mit Methocel, welches aufsteigende Konzentrationen der Proteasominhibitoren **A** Bortezomib, **B** (S)-MG132 sowie **C**, **D** (R)-MG132 enthielt, überschichtet und für 7 d inkubiert. Proteasominhibitor-unbehandelte nichtinfizierte sowie infizierte Caco-2 dienten als Kontrollen. Nach der sich anschließenden Fixierung der Zellen und immunzytochemischen Färbung gegen HCMV-IE1/IE2 erfolgte die lichtmikroskopische Quantifizierung der Plaques. Die gestrichelte Linie in A, B, C und D kennzeichnet 50 % der Plaqueanzahlen bezogen auf die Proteasominhibitor-unbehandelten infizierten Caco-2 (Kontrolle, als 100 % definiert) und erlaubte nach der Lotfällung (A, B) eine Abschätzung der EC_{50} -Konzentration jeweils aus den Einzelkurven. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

9.3 Bestimmung der CC_{50} von Bortezomib und (S)-MG132

(s. 5.1.7)

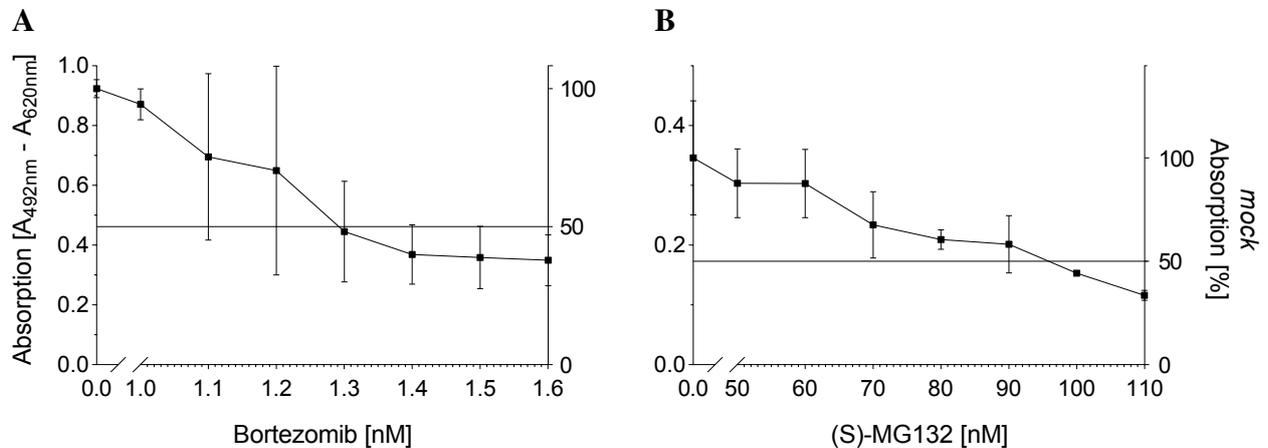


Abb. 9.3 Einfluss von Bortezomib und (S)-MG132 auf die Zellproliferation der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2
 Nichtinfizierte Caco-2 wurden mit 2 % (*v/v*) FCS-EMEM (*mock*) und aufsteigenden Konzentrationen der Proteasominhibitoren für 7 d inkubiert. Nach Durchführung des Cell Proliferation Kit II (XTT) sind die entsprechenden Absorptionen in **A** für Bortezomib sowie in **B** für (S)-MG132 dargestellt, welche prozentual zu *mock* ins Verhältnis gesetzt wurden. Die durchgezogene Linie beider Kurven kennzeichnet 50 % der vitalen Zellen in Bezug zu *mock* (als 100 % definiert) und erlaubte nach der Lotfällung eine Abschätzung der CC_{50} -Konzentration jeweils aus den Einzelkurven. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

9.4 Mikroskopische Darstellung nichtinfizierter Caco-2

(s. 6.1, Abb. 6.1 A)

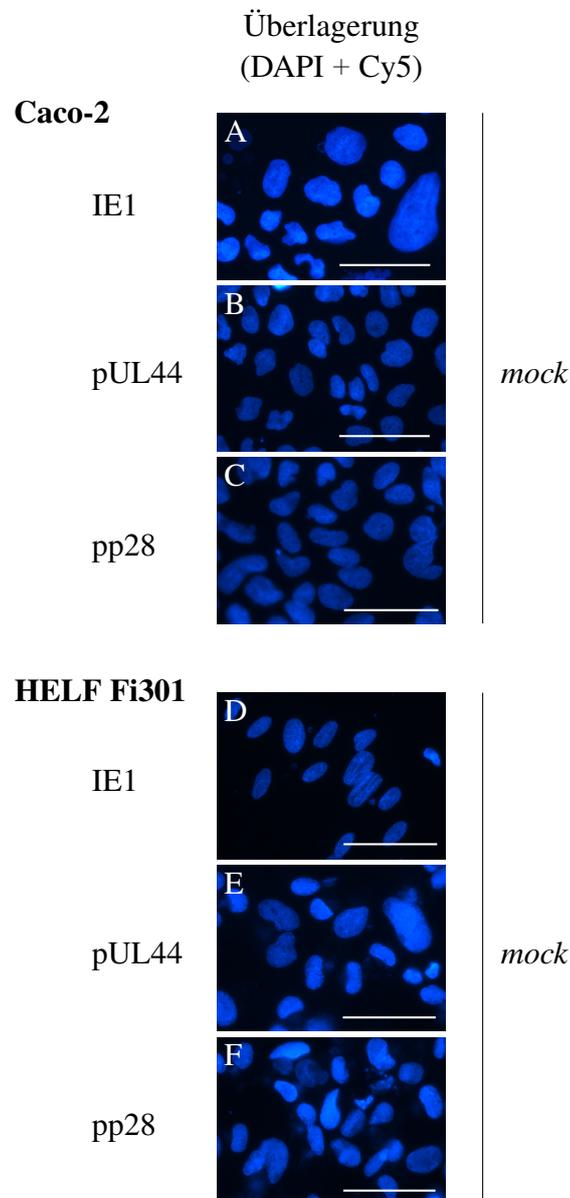


Abb. 9.4 Mikroskopische Darstellung nichtinfizierter Caco-2

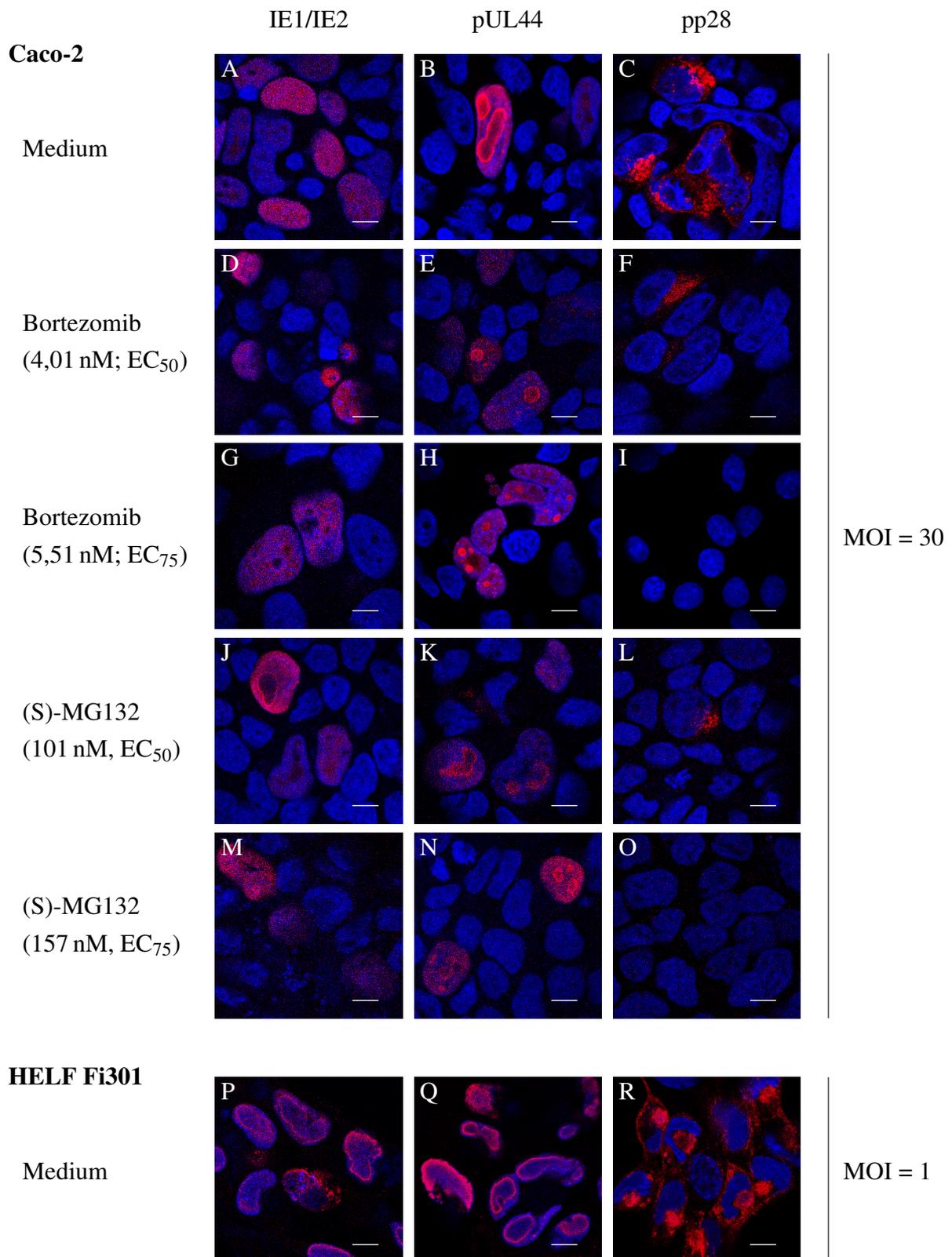
Nach 7-tägiger Kultivierung nichtinfizierter Caco-2- (A, B, C) sowie HEL F i301-Deckglas-Kulturen (D, E, F) (*mock*) in Anwesenheit von 2% (*v/v*) FCS-EMEM wurden diese fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von Primärantikörpern gegen die viralen Proteine IE1 (*immediate early*), *processivity factor* pUL44 (*early*) sowie Tegumentprotein pp28 (*late*). Als Sekundärantikörper diente das Fluorochrom Anti-Maus/Cy5. Durch das DNA-anlagernde Fluorochrom DAPI konnten die Zellkerne gefärbt werden. Dargestellt sind die entsprechenden Überlagerungen der DAPI- und Cy5-Fluoreszenzen nach konventioneller Fluoreszenzmikroskopie. Der Größenstandard entspricht 50 μm . Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind repräsentiert.

9.5 Mikroskopische Darstellung des Einflusses von Proteasominhibitoren

(s. 7.1.2.2, Abb. 7.1)

A

Überlagerung (DAPI + Cy5)



B

Überlagerung (DAPI + Cy5)

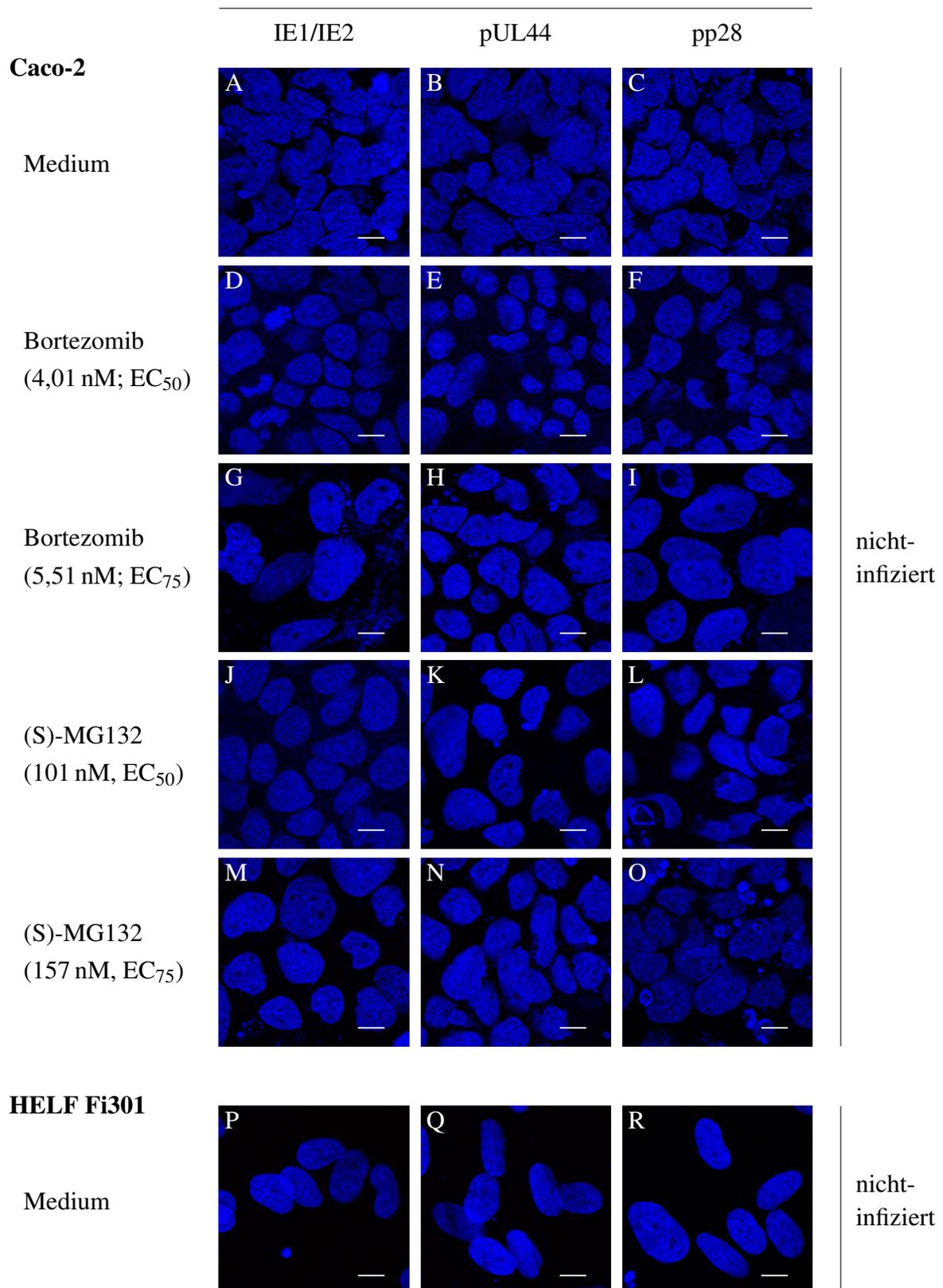


Abb. 9.5 Mikroskopische Darstellung des Einflusses von Bortezomib auf HCMV-infizierte und nichtinfizierte Caco-2

A Die mit dem GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolat mit einer MOI von 30 infizierten und **B** nichtinfizierten Caco-2-Deckglas-Kulturen wurden für 7 d mit 2 % (v/v) FCS-EMEM (je A, B, C), Bortezomib (4,01 nM (EC₅₀) je D, E, F; 5,51 nM (EC₇₅) je G, H, I) sowie (S)-MG132 (101 nM (EC₅₀) je J, K, L; 157 nM (EC₇₅) je M, N, O) behandelt. Infizierte (MOI = 1) und nichtinfizierte HELF Fi301 (Behandlung nur mit serumarmen Medium) (je P, Q, R) dienten als Referenzzelllinie. Im Anschluss erfolgte die Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz. Primärantikörper gegen sehr frühe (IE1/IE2) virale Proteine, dem frühen (*processivity factor* pUL44) und dem späten (Tegumentprotein pp28) viralen Protein sowie der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper anti-Maus/Cy5 kamen zur Anwendung. Durch das DNA-anlagernde Fluorochrom DAPI erfolgte die Zellkernfärbung. Dargestellt sind die entsprechenden Überlagerungen der DAPI- und Cy5-Fluoreszenzen nach Mikroskopie mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Der Größenstandard entspricht 10 µm. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind repräsentiert.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Heike Härtel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Wirkung von Humanem Cytomegalievirus und Bortezomib auf die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all denjenigen, die mich während meiner Promotion unterstützten.

Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger möchte ich für die Möglichkeit, am Institut für Virologie Campus Charité Mitte zu promovieren sowie für die Bereitstellung von Laborräumen, Geräten und Arbeitsmaterialien danken.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Elke Bogner. Ihr danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, für die naturwissenschaftliche Betreuung, die Möglichkeit des selbstständigen Arbeitens, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien sowie für das Korrekturlesen.

Ina Woskobojnik, Ira Napierkowski, Alexandra Dittmer und Janine Theiß danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Frau Dipl.-Biol. Christina Priemer danke ich für die Bereitstellung der Zelllinien und die Weitergabe von Erfahrungen hinsichtlich der Virusanzucht.

Herrn Dr. Martin Raftery danke ich im Besonderen für wichtige Hinweise sowie Überlassung der Reagenzien PicoGreen® und Staurosporin.

Frau Dipl.-Biol. Elisabeth Möncke-Buchner danke ich für die Unterweisung am Mithras LB 940 und die Überlassung des Lambda-DNA-Standards.

Herrn Dr. Lüder Wiebusch, Klinik für Pädiatrie m. S. Endokrinologie, Gastroenterologie und Stoffwechselmedizin, danke ich für methodische Hinweise zur durchflusszytometrischen Quantifizierung viraler Proteine mit Überlassung des Protokolls sowie für die Unterweisung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Eklipse Ti A1/A1R.

Mohammed Yassen danke ich für seine Unterstützung am Durchflusszytometer. Ich wünsche ihm alles Gute und viel Erfolg.