

Aus der Klinik für Kinder und Jugendliche  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Rascher

**Anti-apoptotischer Einfluss von Syncytin-1 in  
Staurosporin-behandelten CHO-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von Kathrin Hermann  
aus Mainz



**Gedruckt mit Erlaubnis der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg**

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schüttler
<b>Referent:</b>	Prof. Dr. Dr. h. c. W. Rascher
<b>Korreferent:</b>	Prof. Dr. rer. nat. A. Hartner
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	6. April 2011

Gewidmet meinem Vater Dr. med. Heiner Hermann, in memoriam.

## Inhaltsverzeichnis

A	Zusammenfassung .....	1
1	Hintergrund und Ziele.....	1
2	Methoden .....	1
3	Ergebnisse .....	2
4	Schlussfolgerungen.....	2
B	Summary .....	4
1	Introduction .....	4
2	Methods .....	4
3	Results .....	5
4	Conclusion .....	5
1	Einleitung.....	6
1.1	Allgemeines zu humanen endogenen Retroviren .....	6
1.2	Syncytin-1 .....	7
1.2.1	Aufbau .....	7
1.2.2	Funktion und Regulation.....	8
1.2.3	Syncytin Rezeptor .....	9
1.2.4	Vorkommen .....	9
1.3	Plazentogenese .....	10
1.3.1	Trophoblast .....	10
1.3.2	Zytotrophoblast und Syncytiotrophoblast.....	11
1.3.3	Gestörte Plazentation, Präeklampsie und IUGR.....	12
1.4	Apoptose .....	13
1.4.1	Definition des Begriffs Apoptose .....	13
1.4.2	Physiologische Bedeutung der Apoptose .....	14
1.4.3	Pathophysiologische Bedeutung der Apoptose .....	14
1.4.4	Morphologische Veränderungen bei der Apoptose .....	15
1.4.5	Der extrinsische Reaktionsweg der Apoptose .....	15
1.4.6	Intrinsischer Reaktionsweg der Apoptose .....	16
1.5	Fragestellung.....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Materialien .....	18
2.1.1	Zelllinien .....	18

2.1.2	Zellkulturmedien .....	18
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Trophoblastenisolierung .....	19
2.2.2	Zellkultur.....	20
2.2.2.1	Vitalitätstestung.....	21
2.2.2.2	Apoptoseinduktion.....	21
2.2.2.3	Stimulation mit cAMP-Agonisten .....	21
2.2.3	Transfektion von Syncytin-1 in CHO-Zellen.....	22
2.2.4	Proteinchemische Standardmethoden.....	23
2.2.5	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	23
2.2.6	Western Blot.....	24
2.2.7	Durchflusszytometrie (FACS) .....	26
2.2.7.1	Allgemeines zur FACS Analyse.....	26
2.2.7.2	Versuchsprotokoll für Annexin V/Propidiumiodid FACS .....	28
2.3	Statistik .....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Vitalität.....	30
3.2	Bcl-2 .....	35
3.3	Caspasen .....	38
4	Diskussion .....	41
4.1	Syncytin-1 und Apoptose.....	41
4.2	Syncytiale Fusion .....	41
4.3	Anti-apoptotischer Einfluss von Syncytin-1 .....	43
5	Literaturverzeichnis.....	44
6	Abkürzungsverzeichnis.....	54
7	Verzeichnis der Vorveröffentlichungen .....	57
8	Anhang .....	58
8.1	Chemikalien.....	58
8.2	Antikörper .....	59
8.3	Fluoreszenzfarbstoffe .....	60
8.4	Verwendete Geräte.....	60
8.5	Puffer und Lösungen .....	61
9	Danksagung.....	63
10	Lebenslauf.....	64

## **A Zusammenfassung**

### **1 Hintergrund und Ziele**

5-7% der Schwangerschaften werden durch hypertensive Schwangerschafts-erkrankungen kompliziert, die zu mütterlicher und perinataler Morbidität und perinatalem Tod führen können. Störungen in der plazentaren Architektur können zu schwerer plazentarer Dysfunktion führen, wie z.B. zu Präeklampsie oder zum HELLP-Syndrom. Es muss darüber diskutiert werden, ob diese Erkrankungen Folge eines veränderten „Syncytin Systems“ sind.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Syncytin-1 Expression in Plazenten von Frauen mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom deutlich reduziert vorliegt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass experimentelle Hypoxie die Expression von Syncytin-1 in BeWo-Zellen reduziert (Knerr et al. 2003).

Die Reduktion der Syncytin Expression als Folge von Hypoxie wird als eine mögliche Ursache für Erkrankungen, wie Präeklampsie und HELLP-Syndrom, angesehen. In vitro wurde außerdem eine reduzierte Zellfusion gefunden (Knerr et al. 2003).

In unserer Studie haben wir untersucht, ob Syncytin-1 überexprimierende CHO-Zellen Einfluss auf apoptotische Prozesse ausüben. Dazu wurden CHO-Zellen nach stabiler Transfektion mit Syncytin-1 (CHO-52) mit Staurosporin, einem Proteinkinaseinhibitor, und/oder Hypoxie inkubiert.

Wir testeten die Hypothese, ob Syncytin-1 überexprimierende CHO-Zellen ein verändertes Apoptoseverhalten zeigen bzw. anti-apoptotische Eigenschaften aufweisen. Im Besonderen lag unser Interesse auf den Mechanismen, die an den anti-apoptotischen Effekten von Syncytin-1 beteiligt sind.

### **2 Methoden**

CHO und CHO-52 Zellen wurden für 6, 12, 18 und 24h mit 500nM und 1µM Staurosporin und/oder 1% Hypoxie inkubiert. Anhand der FACS-Analyse wurden die Vitalität und die Konzentration von Bcl-2 bestimmt. Um mögliche Mechanismen aufzudecken, die wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit

den anti-apoptotischen Effekten von Syncytin-1 stehen, fertigten wir Caspase-3 und Bcl-2 Western Blots an.

### **3 Ergebnisse**

Die Induktion von Apoptose mittels Staurosporin führte bei den Syncytin-1 überexprimierenden CHO-Zellen zu einer verzögerten Apoptoseantwort über den untersuchten Zeitraum von maximal 24h. Die Behandlung mit Staurosporin und Hypoxie verstärkte den Apoptoseeffekt, jedoch zeigten auch hier die CHO-52 Zellen im Vergleich zu den scheinbehandelten Zellen eine viel geringere Apoptoserate.

Die Zelltodrate war bei den Syncytin-1 überexprimierenden Zellen im Durchschnitt 50%-75% geringer als bei den scheintransfizierten CHO-Zellen. Bei den CHO-52-Zellen fiel eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 auf und der Level von aktivierter Caspase-3 war bei den CHO-52- Zellen geringer.

### **4 Schlussfolgerungen**

Wir denken, dass wir mit unseren Untersuchungen zeigen konnten, dass Syncytin-1 nicht nur fusiogene Eigenschaften besitzt (Blond et al. 2000; Mi et al. 2000; Knerr et al. 2003), sondern auch über anti-apoptotische Eigenschaften verfügt.

Syncytin fördert die plazentare Funktion durch seine fusiogenen Eigenschaften während der humanen Schwangerschaft, aber auch der anti-apoptotischen Funktion wird eine bedeutende Rolle zugesprochen.

Hypoxie scheint ein Risikofaktor für eine gestörte Syncytalisation zu sein, wahrscheinlich hervorgerufen durch die Down-Regulation der Syncytin-1 Expression auf transkriptioneller Ebene (Knerr et al. 2003). Syncytin ist an schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen, wie der Präeklampsie beteiligt, bedingt durch eine gestörte Genexpression oder ein verändertes Protein.

Dies verstärkt die Hypothese, dass eine reduzierte Expression von Syncytin eine verstärkte Apoptoserate in Plazenten von Frauen mit Präeklampsie zur Folge hat (Huppertz et al. 2006). Grund hierfür könnte ein Mangel an anti-apoptotischen Faktoren sein.

Es müssen weitere Untersuchungen folgen, um die Rolle von Syncytin-1 während der normalen plazentaren Entwicklung und bei gestörten Schwangerschaften, wie der Präeklampsie und dem HELLP-Syndrom, weiter zu erforschen.



## **B Summary**

### **1 Introduction**

5-7% of all pregnancies are complicated by hypertensive disorders which may cause maternal and perinatal morbidity and perinatal death.

Disturbances in placental architecture leading to severe placental dysfunction, such as pre-eclampsia or HELLP-syndrome, may therefore be discussed as a consequence of an altered syncytin system. It was recently shown, that syncytin expression is markedly reduced in placental specimens of women with pre-eclampsia or with HELLP-syndrome. It has also been reported that experimental hypoxia reduces the amount of syncytin expression in BeWo cells (Knerr et al. 2003).

Reduction of syncytin expression as a result of hypoxia seems to be one of the mechanisms which cause pre-eclampsia or HELLP-syndrome, also a reduced cell-fusion was found *in vitro* (Knerr et al. 2003).

In our study we investigated whether overexpression of syncytin-1 in CHO cells may exert influence on apoptotic processes. Therefore, we incubated CHO cells after stable transfection with syncytin-1 (CHO-52) in the presence or absence of staurosporine, a kinase inhibitor well characterized to induce apoptosis, and/or hypoxia. We tested the hypothesis whether Syncytin-1 overexpressing CHO cells exhibit anti-apoptotic properties. In particular we were interested in the mechanisms that are involved in the anti-apoptotic effects of Syncytin-1.

### **2 Methods**

CHO and CHO-52 cells were incubated for 6, 12, 18 or 24 hours with 500nM and 1µM staurosporine and/or 1% hypoxia. Using FACS analysis we tested the viability and the expression of Bcl-2. For demonstrating anti-apoptotic functions in syncytin-1 overexpressing CHO cells, we performed caspase-3 and Bcl-2 Western Blots.

### **3 Results**

Following the induction of apoptosis by staurosporine, apoptotic response was delayed in syncytin-1 overexpressing CHO cells over a period of up to 24h. The incubation with staurosporine and hypoxia enhances the apoptotic challenge, but the apoptotic rate was reduced in CHO-52 cells compared with mock-treated.

Furthermore, the cell death rate was decreased by approximately 50-75% in transfected cells in comparison to CHO cells.

CHO-52 cells exhibited a higher expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the level of caspase-3 was reduced in CHO-52 cells.

Our study provides first evidence that syncytin-1 serves anti-apoptotic function and the lessened activation of caspase 3 and an increased expression of Bcl-2 are possible mechanisms.

### **4 Conclusion**

We could demonstrate with our experiments that syncytin-1 does not only possess fusiogenic properties (Blond et al. 2000; Mi et al. 2000; Knerr et al. 2003) but also has an anti-apoptotic function.

Syncytin may facilitate placental function in human pregnancy through its fusiogenic properties but it seems reasonable that its anti-apoptotic function is also necessary. Hypoxia seems to be a risk factor for disturbed placental syncytialisation, possibly due to the down-regulation of syncytin gene expression at the transcriptional level (Knerr et al. 2003). Syncytin may contribute to pregnancy-associated disturbances such as pre-eclampsia, through disturbed gene expression or altered protein function. That strengthens the hypothesis that reduced syncytin-expression causes increased apoptosis in tissue specimens from pre-eclamptic placentas (Huppertz et al. 2006) because of the lack of anti-apoptotic function.

There is a need for more investigations to clarify the role of syncytin-1 in normal placentogenesis and its role in disturbed pregnancies such as pre-eclampsia or HELLP-syndrome.

## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeines zu humanen endogenen Retroviren

Es wird geschätzt, dass 1-8% des humanen Genoms aus retroviralen Sequenzen bestehen, so z.B. aus LTR Elementen (long terminal repeats), die für die Kontrolle der Expression verantwortlich sind. Außerdem findet man überwiegend defekte, provirus-typische interne Regionen wie 1. gag, welche für die Kodierung von Strukturproteinen des Kerns verantwortlich sind, 2. env, welche für die beiden Hüllproteine Transmembran- und Oberflächen-Protein kodiert und 3. pol, welche für die viralen Enzyme wie die Reverse - Transkriptase kodiert, sowie die mobilen hochrepetitiven Retroelemente wie die sogenannten LINES (long interspersed elements).

Der Ursprung der HERVs wird in infektiösen exogenen Retroviren vermutet, die die Wirtszelle nicht zerstören, sondern im Lauf der Evolution sogar nützliche Eigenschaften für den Wirt entwickelten (Li et al. 2001; Costas 2002; Lavillette et al. 2002; Gifford and Tristem 2003).

Aufgrund von Degradation und Mutation über Millionen von Jahren, weisen die meisten der retroviral-ähnlichen Regionen frameshifts (Rasterschubmutationen), eine Menge Stopp-Codons oder Deletionen auf, die die Transkription verhindern (Rote et al. 2004).

Intakte Leserahmen (open reading frames, ORF) liegen jedoch nur für die wenigsten genomischen HERV-Einheiten vor, so dass die Transkription und die Translation von Proteinen von retroviralen Sequenzen nur in sehr geringem Umfang stattfindet (Harris 2002).

Von den mindestens 26 HERV-Familien im Humangenom sind derzeit bekannte Vertreter HERV-W, K und R. Die HERV Bezeichnung ist nicht einheitlich, der nachgestellte Buchstabe richtet sich nach der Aminosäure des t-RNA Primers (z.B. W für Tryptophan) an der Primerbindungsstelle (primer binding site, pbs) der Virus-RNA (Gifford and Tristem 2003).

## 1.2 Syncytin-1

### 1.2.1 Aufbau

Syncytin-1 ist ein humanes Hüll-Glykoprotein, endogen retroviraler Herkunft, das zur sogenannten HERV-W Familie gehört. 1999 ist diese neue HERV-W Familie entdeckt und charakterisiert worden (Blond et al. 1999). In den letzten Jahren ist diese HERV- Familie vermehrt in experimentellen Studien untersucht worden (Blond et al. 1999).

Das komplette Glykoprotein besteht aus 518 Aminosäuren. Es entstehen Transkripte mit einer Länge von knapp 4 Kilobasen (kb) und 8 kb (Mi et al. 2000). Blond et al. (1999) beschrieb als erster diese HERV-Familie, deren cDNA 7,6 kb umfasst und die Gene gag, env und pol enthält. Die ORFs für gag und pol sind durch frameshifts und Stopp-Codons unterbrochen, die die Transkription beenden. Ein intakter ORF wurde für das env-Gen gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass Syncytin ein Zielgen von GCMA (glial cell missing gene) ist, welches zu einer Transkriptionsfaktor Familie gehört (Yu et al. 2002), die durch eine zinkhaltige DNA Bindungsdomäne am Aminoterminus charakterisiert ist. GCMA ist das humane Analogon eines neuronalen Transkriptionsfaktors, der auch für die humane Plazentogenese von Bedeutung ist (Yamada et al. 2000). GCMA spielt eine maßgebliche Rolle bei der Formation des Syncytiotrophoblasten.

Durch die im Syncytingen gefundene GCMA Bindungsregion ist es wahrscheinlich, dass die Expression von Syncytin durch GCMA von plazenta-spezifischen Faktoren reguliert wird, denn die fehlende Regulation der Syncytinexpression führt im Zellkulturmodell erst zu einer gesteigerten Zellfusion und dann zum vermehrten Zelltod (Yu et al. 2002).

Die Proteinkinase A (PKA) stimuliert GCMA, wie durch eine transiente Transfektion von BeWo-Zellen mit PKA gezeigt werden konnte (Knerr et al. 2005). Der Anstieg von GCMA und Syncytin war begleitet von einer Zunahme der Zelldifferenzierung.

### 1.2.2 Funktion und Regulation

Syncytin-1 zeigt Charakteristiken eines Membranproteins und besitzt in vitro ein fusiogenes Potential. In Syncytin-1 transfizierten Zellen verschiedener Zelltypen kommt es zur Ausbildung syncytialer Strukturen oder Riesenzellformationen, welche durch die Zugabe von Syncytin-Antiserum zu unterdrücken sind (Mi et al. 2000).

Die nahezu ausschließliche Expression von Syncytin in humaner Plazenta und seine fusiogene Wirkung führten zu der Hypothese, dass Syncytin möglicherweise von zentraler Bedeutung für die Ausbildung des Syncytiums während der humanen Plazentogenese ist (Blond et al. 2000; Mi et al. 2000; Stoye and Coffin 2000). Der Einsatz von syncytin-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden führte in vitro zu einer Abnahme der Produktion von Syncytin, gefolgt von einer deutlichen Reduktion der Trophoblastenfusion und – differenzierung (Frendo et al. 2003).

Die Expression von Syncytin-1 wird auf verschiedenen Ebenen reguliert: Transkription, alternatives Spleißen, Translation, post-translationale Modifikationen und intrazelluläres Targeting. So werden während der Schwangerschaft verschiedene Spleißformen der Syncytin mRNA gefunden (Blond et al. 1999; Smallwood et al. 2003).

Zusätzlich zu seiner fusiogenen Eigenschaft weist Syncytin eine potentiell immunsuppressive Region in seiner Aminosäuresequenz auf (Blond et al. 1999). Diese könnte bei der mütterlichen Immuntoleranz gegenüber dem Fetus eine Rolle spielen.

In vitro zeigt die Expression von Syncytin-1 einen möglichen protektiven Effekt bei der Infektion durch exogene Retroviren, wie den spleen necrosis virus (Ponferrada et al. 2003).

Es gibt erste Hinweise, dass die Überexpression von Syncytin-1 in CHO-Zellen eine veränderte Apoptoseantwort auf Zelltodstimuli zeigt. Syncytin werden anti-apoptotische Eigenschaften zugesprochen (Knerr et al. 2007).

### 1.2.3 Syncytin Rezeptor

Der Retrovirusrezeptor für Syncytin stellte sich als ein Natrium-abhängiger Transporter für neutrale Aminosäuren (ASCT2) mit einer Substratspezifität für Alanin, Serin und Cystein dar (Sommerfelt et al. 1990; Rasko et al. 1999; Tailor et al. 1999; Kudo and Boyd 2002). Dieser Rezeptor ist auch unter der Bezeichnung B0 oder Typ-D Retrovirus-Rezeptor bekannt (Sommerfelt et al. 1990; Kekuda et al. 1996; Tailor et al. 1999). Das kodierende Gen für das Protein wurde ursprünglich aus einer humanen Chorioncarcinom Zelllinie geklont (Kekuda et al. 1996).

Immunhistochemische Analysen konnten zeigen, dass in der normalen Plazenta ASCT2 überwiegend an der basalen Zytoplasmamembran des Syncytiotrophoblasten in Co-Lokalisation mit Syncytin zu finden ist (Kudo and Boyd 1990; Lee et al. 2001).

Die ASCT2-mRNA-Expression stellt sich deutlich herabgesetzt ab dem 2. Schwangerschaftstrimester dar und zeigt sich relativ stabil ab diesem Zeitpunkt bis zur 40. Schwangerschaftswoche. Bei präeklampsischen Plazenten und Zytotrophoblasten, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, bleibt die ASCT2-mRNA-Expression stabil, wohingegen die Syncytin-mRNA-Expression deutlich reduziert ist. Die Expressionsmuster von ASCT2 und Syncytin korrelieren nicht (Chen et al. 2006). Sie verhalten sich vielmehr gegenläufig.

### 1.2.4 Vorkommen

Syncytin wird beim Menschen und höheren Primaten gefunden (Mallet et al. 2004).

HERV-W ist im humanen Genom nicht als ein komplettes Provirus detektierbar, aber sein Hüllprotein wird in der Plazenta, dort hauptsächlich im Syncytiotrophoblasten, sowie in Chorioncarcinom Zellen, exprimiert. Eine geringe Syncytin-Expression kann in Zytotrophoblasten detektiert werden (Frendo et al. 2003), außerdem wird es in geringem Umfang auch im Hoden exprimiert.

Syncytin ist das env-Protein des defekten endogenen humanen Retrovirus HERV-W, dessen intakter ORF auf Chromosom 7 (Kartenposition 7q21-q22, OMIM 604659) nachgewiesen wurde (Blond et al. 2000; Mi et al. 2000). Ferner konnte eine verringerte Syncytin-Gen-Expression und eine veränderte Proteinverteilung in Plazenten von Frauen mit Präeklampsie gezeigt werden (Lee et al. 2001; Knerr et al. 2002). Es ist möglich, dass in Plazenten von Frauen mit Präeklampsie der Sauerstoffmangel Grund für die Reduktion von der Syncytin-Transkription ist. Zusätzlich konnte eine Reduktion von plazentarer GCMA mRNA bei diesen Frauen gezeigt werden (Chen et al. 2004).

### **1.3 Plazentogenese**

#### **1.3.1 Trophoblast**

Der Konzeptus tritt im Blastozystenstadium mit dem mütterlichen Endometrium in Kontakt. Dieser Schritt wird Implantation genannt. An der Blastozyste entwickeln sich, wenn sie 4 Tage alt ist, die inneren Zellen zum Embryoblasten und die peripher liegenden zum Trophoblasten. Der Trophoblast penetriert die mütterliche Dezidua. Der Trophoblast differenziert sich weiter in den Zytotrophoblasten und den Syncytiotrophoblasten, der von nun an aus zytotrophoblastären Stammzellen gebildet wird. Da der Syncytiotrophoblast über keine eigene regenerative Potenz verfügt, kann ein vorzeitiger Verlust von Zytotrophoblastzellen zu einer Degeneration des Syncytiotrophoblasten führen (Huppertz et al. 1998). Während der weiteren Differenzierung des Trophoblasten entstehen Trophoblastlakunen sowie das Chorion mit Chorionzotten und die Chorionplatte.

### 1.3.2 Zytotrophoblast und Syncytiotrophoblast

Die frühe Plazentogenese findet unter relativ hypoxischen Bedingungen statt.

Durch den physiologischen Sauerstoffmangel wird der Zytotrophoblast zur Proliferation angeregt. Ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck in der Nähe von Blutgefäßen begünstigt die weitere Differenzierung (Genbacev et al. 1997).

Eine Schlüsselposition für die Differenzierung und syncytiale Fusion von Trophoblastzellen hat die Expression und Aktivität von Caspase-8. Eigentlich haben Caspasen Apoptosefunktion. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass sie einen entscheidenden Einfluss bei Differenzierungsprozessen haben können. Die Downregulation von Caspase-8 bzw. die Inhibition reduziert das Ausmaß an syncytialer Fusion (Black et al. 2004).

Der Syncytiotrophoblast formt die Grenzschicht zwischen dem mütterlichen und kindlichen Kompartiment der Plazenta und ist von lebenswichtiger Bedeutung bezüglich Versorgung und Schutz des wachsenden Fetus.

Der Syncytiotrophoblast ist eine multinukleäre epitheliale Schicht, die sich durch Zell-Zell-Interaktion, Fusion und Differenzierung aus fetalen zytotrophoblastären Zellen bildet (Blond et al. 2000; Mi et al. 2000).

Das gebildete Syncytium ist verantwortlich für nutritive und endokrine Funktionen der Plazenta sowie für die Immuntoleranz (Benirschke and Kaufmann 2000).

Humanes Choriongonadotropin (HCG), ein Polypeptidhormon, ist der früheste Marker in der mütterlichen Zirkulation, der eine Schwangerschaft anzeigt.

Humanes Choriongonadotropin wird vom Trophoblasten synthetisiert und in steigenden Konzentrationen während des 1. Trimesters der Schwangerschaft sezerniert.

HCG-mRNA ist hauptsächlich im Syncytiotrophoblasten detektierbar, kann aber auch im Zytotrophoblasten gefunden werden (Hoshina et al. 1982).

Immunhistochemische Studien konnten ebenfalls zeigen, dass HCG überwiegend im Syncytiotrophoblasten zu finden ist (Gosseye and Fox 1984; Kurman et al. 1984).



### 1.3.3 Gestörte Plazentation, Präeklampsie und IUGR

Die Bildung des multinukleären Syncytiotrophoblasten ist ein entscheidender Schritt für die physiologischen Konditionen, die während der Schwangerschaft gefordert sind (Benirschke and Kaufmann 2001).

In GCMA-defizienten Plazenten konnte kein Syncytiotrophoblast gebildet werden (Anson-Cartwright et al. 2000).

Präeklampsie, klinisch definiert durch Bluthochdruck und Proteinurie während der Schwangerschaft (Report of National High Blood Pressure Education Programm (2000)), ist immer noch ein Hauptgrund für maternale und perinatale Morbidität. Obwohl die Pathogenese weiterhin ungeklärt ist, handelt es sich wahrscheinlich um eine abnormale plazentare Entwicklung mit Veränderungen in der lokalen Sauerstoffverfügbarkeit (Kingdom and Kaufmann 1999; Goldman-Wohl and Yagel 2002). Unter hypoxischen Bedingungen konnte eine Erniedrigung von Syncytin auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden (Knerr et al. 2003; Kudo et al. 2003).

Präeklampsie und IUGR komplizieren 5-10% aller humanen Schwangerschaften. Folgen daraus sind fetale oder neonatale Mortalität oder Morbidität (Sibai 1992; Myers and Baker 2002; Sibai et al. 2003).

Eine Hemmung der Differenzierung von zytotrophoblastären Zellen ist mit einer späten Form der Präeklampsie und IUGR assoziiert (Khong et al. 1986).

Im Gegensatz dazu steht die reduzierte Verzweigung von Chorionzotten, die mit einer schweren frühen Form der IUGR einhergeht (Krebs et al. 1996).

Bei der Präeklampsie sind pathologisch-anatomische Korrelate, dass man Anzeichen einer plazentaren Reifungsstörung findet, unzureichende Zottenreifung, zu geringe Konversion maternaler Spiralarterien sowie eine mangelnde Invasion des Trophoblasten (Cross 2000; Lyall et al. 2001; Goldman-Wohl and Yagel 2002).

Wie bereits erwähnt, gibt es zunehmende Hinweise auf die klinische Bedeutung von Syncytin bei gestörter humaner Plazentogenese, so z.B. bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen und beim HELLP-Syndrom (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) finden sich eine reduzierte Syncytinexpression im Syncytiotrophoblasten (Keith et al. 2002; Knerr et al. 2002).

Es fällt nicht nur eine quantitative Reduktion von Syncytin bei Präeklampsie auf, sondern auch eine qualitative Verschiebung des Syncytinproteins. Es findet sich statt im basalen Bereich der Zytoplasmamembran nun im apikalen Bereich (Lee et al. 2001).

## **1.4 Apoptose**

### **1.4.1 Definition des Begriffs Apoptose**

Die moderne Definition der Apoptose als eigenständige Form des Zelltodes, vor allem in Abgrenzung zur Nekrose, wird Kerr, Currie und Wyllie (1972) zugesprochen. Kerr hat diese besondere Form des Zelltodes zunächst als „shrinkage necrosis“ (Schrumpfungsnekrose) bezeichnet. Seine Mitarbeiter etablierten schließlich 1972 den Begriff „Apoptose“.

Der Begriff setzt sich aus zwei griechischen Wörtern, apo (weg) und ptosis (Fall) zusammen und soll an das Herabfallen des Herbstlaubes erinnern.

Im Gegensatz dazu steht die Nekrose, bei der die gesamte Zelle mit ihren Organellen, wie Nukleus und Mitochondrien schwillt und die Plasmamembran nicht länger fähig ist, die Passage von Ionen und Wasser zu kontrollieren. Die Zellbestandteile laufen aus und es resultiert eine Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe (Searle et al. 1982).

Neben diesen zwei Extremen von Zelltod wurde auch eine Zwischenform gefunden, die Aponekrosis (Formigli et al. 2000). Sie zeigt an ein und derselben Zelle Anzeichen von Apoptose und Nekrose. Es handelt sich hierbei um eine abgeschwächte Form der Apoptose mit einer Verlagerung in Richtung Nekrose.

### **1.4.2 Physiologische Bedeutung der Apoptose**

Der regulierte, programmierte Zelltod eukaryontischer Zellen spielt bei mehrzelligen, gewebebildenden Organismen eine wesentliche Rolle. Während der Embryonalphase dienen apoptotische Prozesse hauptsächlich der Formbildung und Funktionsreifung. Im ausgewachsenen Organismus unterstützen Apoptosen die Zustandserhaltung und –wiederherstellung. So ist die Gastrulation des frühen Embryos eine Folge des gezielten Absterbens von Zellen im Inneren der Blastula (Joza et al. 2001).

In der Schwangerschaft hat die Apoptose eine zentrale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der plazentaren zellulären Homöostase (Levy and Nelson 2000; Morrish et al. 2001).

### **1.4.3 Pathophysiologische Bedeutung der Apoptose**

Eine wichtige Funktion der Apoptose ist die Entfernung von kranken, defekten, überschüssigen oder entarteten Zellen, um eine Schädigung des Gewebes bzw. des Organismus zu verhindern. Schwerwiegende Krankheiten können die Folge einer Fehlregulation der Apoptose sein. Eine Erhöhung der Zelltodrate ist bei neurodegenerativen Erkrankungen zu finden (Thompson 1995; Nicholson and Thornberry 1997; Strasser et al. 1997; Bouillet et al. 1999).

Fehlfunktionen können auch durch Mutationen oder auf Grund viraler Infektionen entstehen.

Die Entstehung von Krebs und einigen Autoimmunkrankheiten beruht auf einer verminderten Apoptoserate bzw. dem Verlust der Fähigkeit zur Apoptose (Thompson 1995; Nicholson and Thornberry 1997; Strasser et al. 1997; Bouillet et al. 1999).

Es ist bekannt, dass Fehlfunktionen während der Plazentation mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert sind (DiFederico et al. 1999).

#### **1.4.4 Morphologische Veränderungen bei der Apoptose**

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein aktiver Prozess, der von typischen morphologischen Veränderungen geprägt ist: Ablösen der Zelle aus dem Gewebeverband und Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und Fragmentierung der DNA, Zerlegung des Nucleus und der Zisternen des ER und des Golgiapparates, Fragmentierung der Cytoskelettbestandteile, Umlagerung von Phosphatidylserin von der Membraninnen- auf die Membranaußenseite. Schließlich kommt es zum Zerfall der gesamten Zelle in apoptotische Körperchen. Äußere und innere Signale lösen diese finalen Prozesse aus (Arends and Wyllie 1991; Kerr et al. 1994; Takahashi and Earnshaw 1996).

#### **1.4.5 Der extrinsische Reaktionsweg der Apoptose**

Der extrinsische Reaktionsweg erfolgt über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren wie beispielsweise TNFR1, TRAIL oder Fas. Die genannten Transmembranproteine befinden sich permanent in den Zellmembranen aller Zellen und trimerisieren nach Andocken von Todesliganden. Auf der Zellinnenseite des Trimerkomplexes lagern sich Adaptormoleküle an, an die sich wiederum Initiator-Procaspasen-8 binden. Die räumliche Nähe mehrerer Procaspasen-8 zueinander reicht aus, um eine gegenseitige Aktivierung zu initiieren. Die aktivierten Caspasen lösen sich von den Rezeptoren und regen ihrerseits Effektor-Procaspasen an. Caspase-8 aktiviert Bid zu tBid (Luo et al. 1998), das dann wiederum Bak und Bax stimuliert (Wei et al. 2001). Letztere bewirken die Zerstörung der mitochondrialen Membranintegrität, was dann die Bildung von Apoptosomen zur Folge hat.

Ein Apoptosom ist eine heptagonale Struktur (Cain et al. 1999; Beere et al. 2000; Cain et al. 2000), deren Kernkomplex aus sieben speichenförmig angeordneten Apaf-1 Molekülen besteht (Li et al. 1997; Zou et al. 1997).

#### 1.4.6 Intrinsischer Reaktionsweg der Apoptose

Der intrinsische Reaktionsweg beginnt mit der Autoaktivierung der Initiator-Procaspasen-9, an den Apoptosomen, die sich aufgrund des Zusammenbruchs der mitochondrialen Membranregulation bilden (Srinivasula et al. 1998). Apaf-1 liegt als inaktive Vorstufe im Cytoplasma vor und wird erst durch das mitochondriale Smac (second mitochondrial activator of caspases) aktiviert.

Durch die Anlagerung von Cytochrom c macht Apaf-1 eine Konformationsänderung durch, wodurch jeweils 7 Moleküle zu einem Radkomplex oligomerisieren können.

Jedes Apaf-1 rekrutiert dann aus dem Cytosol eine Initiator-Procaspase-9. Die aktivierten Caspasen-9 lösen sich vom Apoptosom und aktivieren Effektor-Procaspasen.

Aufgabe der Caspasen ist es, den proteinösen Zellinhalt zu zerlegen. Das „C“ steht für **C**ystein und „**aspase**“ für **A**spartat-spaltend (Stennicke and Salvesen 1998). Caspasen sind Cysteinproteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Sie spalten ihre Substrate hinter einem Aspartatrest. Beim Menschen sind bereits 15 verschiedene Caspasen beschrieben worden. Caspasen können sich gegenseitig aktivieren und bilden zusammen die sogenannte Caspasen-Kaskade (Nunez et al. 1998). Abhängig von ihrer Aktivierungsweise und ihrem Substrat werden **Initiator-** und **Effektor-Caspasen** unterschieden. Als Effektor-Caspasen im engeren Sinne werden bei Vertebraten die Caspasen-3, 6 und 7 bezeichnet (Slee et al. 2001).

Einige Caspasen aktivieren direkt oder indirekt bestimmte Endonucleasen, die die Zellkern-DNA fragmentieren.

Durch die laufende Kaskade werden Bid, Bak und Bax aktiviert, die direkt auf die Mitochondrien einwirken und so den Aktivierungskreis verstärken.

## **1.5 Fragestellung**

Da Syncytin-1 im Zusammenhang mit der Plazentogenese steht, die Apoptose eine zentrale Rolle bei der placentaren Homöostase und bei Schwangerschaftsgestosen spielt, erschien es uns von großer Bedeutung, diese Mechanismen anhand eines Zellkulturmodells zu erforschen.

Deshalb haben wir uns mit der Frage beschäftigt, inwieweit Syncytin-1 anti-apoptotisch in CHO-Zellen wirkt, die mit Staurosporin und/oder Hypoxie behandelt wurden. In unserer Studie haben wir mögliche Mechanismen, die für die anti-apoptotische Wirkung in Frage kommen, analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

##### Eukaryontische Zelllinien

CHO	Chinese Hamster Ovary Cells, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
BeWo	humane Chorioncarcinom Zellen, DSMZ, Braunschweig

##### Primärzellen

Reife humane Trophoblasten

#### 2.1.2 Zellkulturmedien

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM/F-12, 1:1)	GIBCO, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA, Coelbe
Medium 199	PAA, Coelbe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Coelbe
Penicillin/Streptomycin Lösung	Sigma, München
Trypsin/EDTA (1 fach)	Sigma, München
Hygromycin B	PAA, Coelbe

Hepes 1M	Sigma, München
Fungizone	Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
CHO	RPMI 1640 mit Zusatz von 10% FKS und 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
BeWo	DMEM/F-12 mit Zusatz von 10% FKS und 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin
Trophoblasten	Medium 199 mit Zusatz von 10% FKS und 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1ml/500ml Hepes 1M, 5ml/500ml Fungizone, 3,4ml/500ml L-Glutamin

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Trophoblastenisolierung

Die Sectio-Plazenten stammten von gesunden, termingebärenden Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft, die in der Frauenklinik der Universität Erlangen/Nürnberg entbunden haben. Ein positives Ethikvotum der Medizinischen Fakultät Erlangen/Nürnberg lag vor.

Die Trophoblastenisolation erfolgte modifiziert nach einem vorveröffentlichten Protokoll (Kliman et al. 1986; Schild et al. 2002).

Zunächst wurden die Nabelschnur, die Hüllen und die Oberfläche der mütterlichen Seite der Plazenta entfernt. Das restliche Gewebe wurde zuerst in Stücke geteilt und dann mit einer Klinge in kleine Schabsel geschnitten und in 0,9%-iger NaCl Lösung steril gesammelt, mehrmals gespült und in einem Sieb, das mit einem Verbandmull (Janomed, Wildeshausen) ausgelegt war, aufgefangen. Das Plazentagewebe wurde in einen Kolben mit Medium überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schabsel erneut mit 3-4 l 0,9%-iger NaCl Lösung über einem Verbandmull



gespült und in die vorbereitete Verdauungslösung (500 ml Hank's Puffer (Gibco, Kalsruhe), 200 mg Trypsin (Sigma, München), 120 mg DNase I (Roche, Mannheim), 20 ml Dispase (BD Biosciences, Becton, Dickenson, Heidelberg)) gegeben und für 30 min bei 37° C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 30 min wurden erneut 20 mg Trypsin und 30 mg DNase hinzugefügt. Die Schabbeln wurden erneut über einen Verbandsmull filtriert und in einem mit NKS (PAA, Coelbe) gefüllten Becher aufgefangen und in 50 ml Falcons abgefüllt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 1250 rpm. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Pellets in Medium resuspendiert. Zur Trennung von Trophoblasten und Erythrozyten wurden je 2,5 ml über den vorbereiteten Gradienten geschichtet und erneut für 30 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Als Ergebnis erhielt man zwei Banden. Der Trophoblastenring, der sich knapp über dem Erythrozyten Ring befand, wurde mit einer Pasteurpipette aufgesaugt, in Medium resuspendiert, für 15 min bei 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden entweder sofort verwendet oder alternativ bei -80°C weggefroren.

### **2.2.2 Zellkultur**

Alle Arbeiten wurden unter einem Flow mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial durchgeführt. Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium unter Standardzellkulturbedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit oder unter hypoxischen Bedingungen bei 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 94% N<sub>2</sub> in einem Inkubator (Thermo Forma cell incubator, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) kultiviert.

Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden 1:2 oder 1:10 Verdünnungen hergestellt. Die Zellen wurden geerntet, wenn sie mindestens eine Konfluenz von 80% erreicht hatten.

Das Medium wurde abpipettiert, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin inkubiert. Nach 2-3 min im Brutschrank wurde das Trypsin mit 10 ml Medium deaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Falcon, in dem 10 ml Medium vorgelegt waren, überpipettiert und das Ganze wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert.

#### **2.2.2.1 Vitalitätstestung**

Die Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt, gezählt und ein passender Anteil in neue Zellkulturschalen, -flaschen oder in 6-well-Platten (Becton, Dickinson, Schubert&Weiß, München) ausgesät.

#### **2.2.2.2 Apoptoseinduktion**

Zur Induktion der Apoptose diente Staurosporin in einer Konzentration von 500nM und 1µM für 6, 12, 18 und 24h. Staurosporin ist ein antimikrobielles Alkaloid-Antibiotikum und ist der stärkste Inhibitor der Proteinkinase C. Es hemmt außerdem die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Außerdem wurden Staurosporin zytotoxische Effekte auf verschiedene Tumorzelllinien zugesprochen.

Desweiteren wurde zusätzlich noch Hypoxie (1% O<sub>2</sub>, für 6, 12, 18, 24 und 48h) zur Apoptoseinduktion eingesetzt.

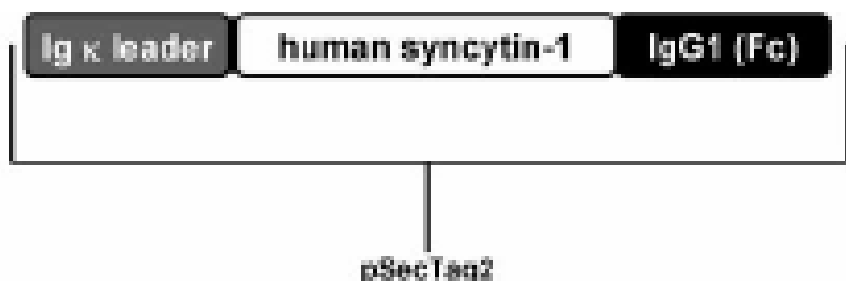
#### **2.2.2.3 Stimulation mit cAMP-Agonisten**

Es erfolgte außerdem eine Stimulation der Zellen mit 8-Bromo-cAMP oder Forskolin. Es ist bekannt, dass diese beiden cAMP-Agonisten die endogene Syncytin-1 Expression induzieren (Knerr et al. 2005) und daraus eine gesteigerte Syncytiumbildung resultiert. Desweiteren soll durch die beiden cAMP-Agonisten die Zelldifferenzierung gefördert werden.

### 2.2.3 Transfektion von Syncytin-1 in CHO-Zellen

Es ist weit verbreitet, CHO-Zellen für die Produktion von glykosilierten und rekombinanten Proteinen zu verwenden. Die Möglichkeit der Transfektion ist bei CHO-Zellen gut, und transfizierte Zellen behalten die Fähigkeit, die Apoptose-Maschinerie aufrecht zu erhalten (Mi et al. 2000). Dies führte dazu, dass wir eine CHO Zelllinie etablierten, die das Syncytin-1-Genprodukt stabil exprimiert. Es wurde der Vektor pSecTag2 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der eine Sequenz für Proteinexocytose beinhaltet. Der Vektor wurde mit einer Ig  $\kappa$  leader Sequenz, die für die Expression von Proteinen zuständig ist, und mit der Syncytin-1-cDNA beladen. Vorher wurde das c-terminale *myc* Epitop der Syncytin-1-cDNA durch ein humanes IgG1 (Fc) Epitop ersetzt. Anschließend erfolgte die Transfektion über die physikalische Methode der Elektroporation. 10  $\mu$ g gereinigte Syncytin-1-Plasmid DNA wurden in  $10^7$  CHO-Zellen (gelöst in 0,8 ml Medium) bei 900  $\mu$ F und 260 Volt (entspricht Ladung) mit einer Easyject-Electroporation-Einheit (Eurogentec, Köln) elektroporiert. Nach 24h wurden die Zellen mit Hygromycin B (Invitrogen, Karlsruhe, 0,4 mg/ml) behandelt. Nach 2 Wochen wurden die mRNA und die Proteinexpression der überlebenden Klone durch Real-Time PCR und Western Blot überprüft. Ein Hygromycin B resistenter Klon (CHO-52) wurde für die weiteren Experimente benutzt. Die Kontrollzellen (CHO) wurden nur mit dem Vektor pSecTag2 transfiziert (Knerr et al. 2007).

**Abbildung 2.1:** Konstrukt des benutzten Vektors pSecTag2 für die humane Syncytin-1 Sequenz



#### **2.2.4 Proteinchemische Standardmethoden**

Das Medium wurde abgegossen, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 500 µl modifiziertem RIPA Puffer für 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf Cups portioniert und für 1h auf Eis gestellt. Danach wurde die Zellsuspension in den Eppendorf Cups bei 15000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in neue Eppendorf Cups verteilt und das Zellpellet verworfen.

Aus dem Überstand wurde in einem nächsten Schritt die Proteinkonzentration bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BCA™ Protein Assay Kit der Firma Perbio, Bonn.

In der Standardreihe wurde der modifizierte RIPA Puffer mit Albumin 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1 verdünnt. Der modifizierte RIPA Puffer diente als Leerwert (Blank).

Die Proteinlösung wurde mit dem RIPA Puffer 1:2 und 1:10 verdünnt.

Durch die Messung der Extinktion bei 562 nm im Vergleich zum Standard konnte anschließend die Proteinkonzentration berechnet werden.

Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden die RIPA-Lysate bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.5 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für eine SDS-Gelelektrophorese wurde je Spur eine definierte, gleiche Menge an Probe mit einem Endvolumen von 40 µl eingesetzt. Entsprechend der berechneten Proteinkonzentration wurde dem RIPA-Lysat eine bestimmte Menge entnommen, dieses mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und das Ganze mit modifiziertem RIPA-Puffer aufgefüllt. Die eingesetzte Menge an Protein entsprach einem Volumen von 25 µg oder 50 µg. Vor Beladung des Gels wurde dieses Gemisch bei 95 °C für 10 min im Heizblock denaturiert. Vom Standard (Prestained SDS-PAGE Standard, BioRad, München) wurden 5µl eingesetzt.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli 1970) wurden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und

danach in einem höherprozentigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden homologe Trenngele von einem Vernetzungsgrad von 12% hergestellt, die über Nacht polymerisierten. Das Trenngel wurde mit einem 5%-igen (w/v) Sammelgel überschichtet. Nach der Polymerisation des Sammelgels, die ca. 1h in Anspruch nahm, wurde das Gel in eine Vertikal Elektrophoresekammer eingespannt und die Reservoirs mit Laemmli-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 1h bei 90V und für weitere 1 bis 2h bei 120V.

Trenn- und Sammelgele hatten folgende Zusammensetzung:

	Trenngel(12%)	Sammelgel(5%)
	25ml	5ml
Deionisiertes Wasser	8,2ml	3,4ml
Acrylamid Lösung (30%)	10,0ml	830 $\mu$ l
Trenngelpuffer	6,3ml	
Sammelgelpuffer		630 $\mu$ l
SDS (10%)	250 $\mu$ l	50 $\mu$ l
APS (10%)	250 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l

### 2.2.6 Western Blot

Die über die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden über Elektrotransfer (semi-dry Blot) auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatmann, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Die Nitrocellulose-Membran und das Filterpapier, die zuvor in der Größe des Gels zurecht geschnitten wurden, wurden für 5min im Transferpuffer inkubiert. Die Blotkammer wird folgendermaßen beschichtet: Zuerst 2 gesättigte Lagen Filterpapier, das Trenngel, die Nitrocellulose-Membran und zuletzt 2 weitere Lagen Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 60 bis 90 min bei 1,2mA/cm<sup>2</sup> Trenngelfläche.

Zur Kontrolle des Proteintransfers dienten zum einen der direkt sichtbare vorgefärbte Proteingrößenstandard und eine Färbung mit Ponceau S. Der

reversible Farbstoff Ponceau S färbt Proteine. Die Nitrocellulose-Membran wurde dazu 1 min in Ponceau S geschwenkt. Dabei wurden Proteinbanden sichtbar. Der Farbstoff konnte durch mehrmaliges Waschen in TBS-T entfernt werden.

Zur spezifischen Proteindetektion wurde die Membran in Blockierungslösung (5% (w/v) Milchpulver in 1x TBS-T) für 2h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper (Anti-Aktin, 1:2500; Anti-active-Caspase-3, 1:500; Anti-Bcl-2, 1:200) unter Schütteln über Nacht bei 4 ° C.

Die Membran wurde zweimal in TBS-T und einmal in TBS für je 15min gewaschen.

Danach wurde die Membran mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (Anti-goat IgG, 1:1000; Anti-rabbit IgG, 1:2500) für eine Stunde inkubiert. Vor der Entwicklung wurde die Nitrocellulose-Membran noch mal in gleicher Weise gewaschen, wie zuvor berichtet.

Ein  $\beta$ -Aktin Blot wurde bei allen Blots als Ladekontrolle mitgeführt.

Die ECL-Methode (ECL-Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ist eine Licht emittierende, nicht-radioaktive Nachweismethode zur Detektion von immobilisierten Antigenen mit Peroxidase gekoppelten Antikörpern. Die Peroxidase ist mit dem Sekundärantikörper gekoppelt und katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion, die auf einem Röntgenfilm (Kodak® BioMax Light Film, Sigma, München) detektiert werden kann. Die Entwicklungsarbeiten fanden in einer Dunkelkammer unter Rotlicht statt. Die Detektionsreagenzien A und B des ECL-Kits wurden nach Angaben des Herstellers gemischt und die Nitrocellulose-Membran wurde in der Lösung 5 min inkubiert. Anschließend wurde die in Klarsichtfolie verpackte Nitrocellulose-Membran mit dem Röntgenfilm von Kodak in eine Röntgenkassette gelegt und für 30 sec oder bis zu 10 min belichtet. Zuletzt wurde der Röntgenfilm in einer Röntgen-Entwicklerlösung entwickelt und mit einer Röntgen-Fixierlösung fixiert.

Um mit einer Nitrocellulose-Membran einen erneuten Immunoblot durchführen zu können, muss sie zuerst von den vorher eingesetzten Antikörpern befreit werden. Dazu wurde sie 3mal für 10 min in TBS-T gewaschen. Währenddessen versetzte man 10 ml des Stripping-Puffers mit 70  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und

heizte das Wasserbad auf 50 °C vor. Die Membran wurde mit dem Stripping-Puffer in Folie eingeschweißt und im vorgeheizten Wasserbad für 45 min inkubiert. Anschließend wurde der Stripping-Puffer verworfen, die Membran erneut für 10 min in TBS-T gewaschen und danach für 2 h in Blockierungslösung geblockt.

Nun konnte in gleicher Weise, wie bereits beschrieben, mit der Inkubation des ersten Antikörpers fortgefahren und dann nach dem Protokoll des Immunoblots weiterverfahren werden.

Die gezeigten Western Blot Analysen sind in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt worden.

## **2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)**

### **2.2.7.1 Allgemeines zur FACS Analyse**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Dazu werden Zellen, die sich in einer Suspension befinden, durch ein Ansaugsystem in eine Meßküvette geleitet, wo sie vom fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle beleuchtet werden. Durch die laminare Strömung in der Meßküvette wird gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen wie Perlen an der Kette den Messpunkt an einer definierten Stelle passieren (Hydrodynamische Fokussierung). Die vom Lichtstrahl getroffene Zelle streut in Abhängigkeit von ihren physikalischen Eigenschaften, wie Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Struktur der Membran und intrazelluläre Bestandteile, Licht in unterschiedlicher Quantität und Qualität. An Streulicht unterscheidet man den sogenannten „forward scatter“, das Streulicht längs zum Anregungslichtstrahl und den „side scatter“, das Streulicht im rechten Winkel zu dieser Achse streut. Der forward scatter ist dabei in erster Linie ein Maß für die Zellgröße (kleine Zellen streuen weniger), während der side scatter vor allem die intrazelluläre Granularität misst. Eine Klassifizierung von Zellgemischen oder Zellpopulationen mit bestimmten Eigenschaften kann bestimmt werden durch Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen zellspezifische Oberflächenrezeptoren oder mit Farbstoffen, die intrazelluläre Strukturen

anfärben. Die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle werden durch das optische Detektionssystem und die Elektronik erfasst.

Geeignete Lichtquellen sind Bogenlampen oder Laser, wobei der Laser die weiteste Verbreitung gefunden hat. Der Laser emittiert Licht, das von hoher Energiedichte und monochromatisch ist.

Die Signalumwandlung erfolgt durch Photodetektoren, die die optischen Signale in elektrische Impulse konvertieren, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korreliert.

Moderne Durchflusszytometer bieten verschiedene Möglichkeiten in der Anwendung.

In der vorliegenden Arbeit diente die Durchflusszytometrie (Durchflußzytometer, FACS Calibur, Becton-Dickinson, Heidelberg) der Apoptosebestimmung mittels an Annexin V gekoppeltem Fluorescein (FITC). Desweiteren wurde die Konzentration von Bcl-2 über eine FACS Analyse bestimmt. Hierbei diente das modifizierte Hölzel Protokoll als Grundlage. Bcl-2 wurde mit Hilfe eines monoklonalen Anti-humanen Bcl-2 Antikörpers (Becton, Dickinson, Heidelberg) und einem an Phycoerythrin konjugierten Anti-mouse Sekundärantikörpers (Dake, Hamburg) detektiert.

Die Voraussetzung für die korrekte Identifizierung relevanter Zellpopulationen ist die exakte Einstellung des Gerätes anhand einer ungefärbten Negativkontrolle vor der eigentlichen Einmessung. Hierbei erfolgt zunächst die Anpassung an die physikalischen Parameter FSC und SSC, sowie ein Nullabgleich der Fluoreszenzkanäle zum Ausschluss von unspezifischer Fluoreszenz (z.B. Autofluoreszenz der Zelle).

Für die Gerätegrundeinstellung als auch für die Auswertung besteht die Möglichkeit, die Proben nach ein oder zwei Parametern gegeneinander aufzutragen. Wenn nur ein Parameter aufgetragen wird, ergibt sich ein Histogramm, in dem die Häufigkeitsverteilung im jeweiligen Fluoreszenzkanal abgebildet wird. Ein so genannter dot blot ergibt sich bei zwei gegeneinander aufgetragenen Parametern. Hierbei werden die einzelnen Zellen meist in Form von Punktwolken (Messpunkten= dots) gezeigt. Die Punktwolken bilden die Populationen ab, die in bestimmten Eigenschaften (Größe und Granularität) übereinstimmen. Die gesuchten Populationen lassen sich durch so genannte



Gates isolieren, deren Lage vom Auswerter manuell eingestellt werden kann. Die in den Gates eingegrenzten Messereignisse können in Bezug zu allen eingemessenen Ereignissen (events) gesetzt oder durch Verknüpfung mehrerer Gates ins Verhältnis zueinander gebracht werden. Durch Einstellung eines Schwellenwertes, den so genannten Threshold, können unerwünschte Partikel aus der Messung ausgeschlossen werden. Er wird ebenfalls mit Hilfe einer ungefärbten Zellsuspension eingestellt. Alle Partikel, die Impulse unterhalb des Schwellenwertes erzeugen, werden automatisch aus der Analyse ausgeschlossen, was die Menge an relevanten Messdaten erhöht.

Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) besitzt die Eigenschaft, nur durch defekte Zellmembranen in die Zellen einzudringen. Inkubiert man die Zellen vor der Messung für 10 min mit PI, so kann man den Anteil toter Zellen in der Zellsuspension bestimmen.

Man braucht Annexin V-FITC um quantitativ die Prozentzahl an apoptotischen Zellen zu ermitteln. In der frühen Phase der Apoptose kommt es zu Veränderungen an der Zellmembran. In dieser Phase wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Membraninnenseite auf die Membranaußenseite verlagert und so dem extrazellulären Umfeld exponiert. Annexin V hat eine hohe Affinität zu PS. Es ist an den Fluoreszenzmarker FITC gekoppelt und somit geeignet, um apoptotische Zellen mit exponiertem PS zu identifizieren.

Zellen, die positiv für Annexin V-FITC und negativ für PI sind, befinden sich im frühen Stadium der Apoptose. Doppelt positive Zellen befinden sich im Endstadium der Apoptose, sind im Prozess der Nekrose oder sind bereits abgestorben. Doppelt negative Zellen sind vital und begehen keine messbare Apoptose.

#### **2.2.7.2 Versuchsprotokoll für Annexin V/Propidiumiodid FACS**

Die in 6-Well-Platten ausgesäten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% mit Staurosporin oder einem anderen Apoptoseinduktor behandelt.

Entsprechend den Versuchen wurden die Konzentration und die Inkubationszeit variiert.

Das Zellmedium wurde abpipettiert, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 500µl trypsinisiert und ca.  $1 \times 10^6$  Zellen isoliert und direkt ins Facs Röhrchen überpipettiert. 3 ml Medium wurden der Zellsuspension zugefügt, um das Trypsin zu deaktivieren.

Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm, bei 20 °C für 5 min. Danach wurde das Zellmedium abgesaugt und das Pellet mit 100 µl Annexin-Binding-Puffer resuspendiert.

Diesem Gemisch wurden 5 µl Annexin V-FITC (1:10, Responsif, Erlangen) und 2 µl Propidiumiodid (Sigma, München) hinzugefügt. Danach wurde es im Kühlschrank für 10min inkubiert.

Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen anhand der Durchflusszytometrie. Alle gezeigten FACS Analysen wurden mindestens dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### **2.3 Statistik**

Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler) dargestellt.

Die statistische Evaluation erfolgte unter Verwendung der Software GraphPad Prism 5.0. Zur Testung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test verwendet und die statistische Signifikanz für  $p < 0,05$  festgelegt.

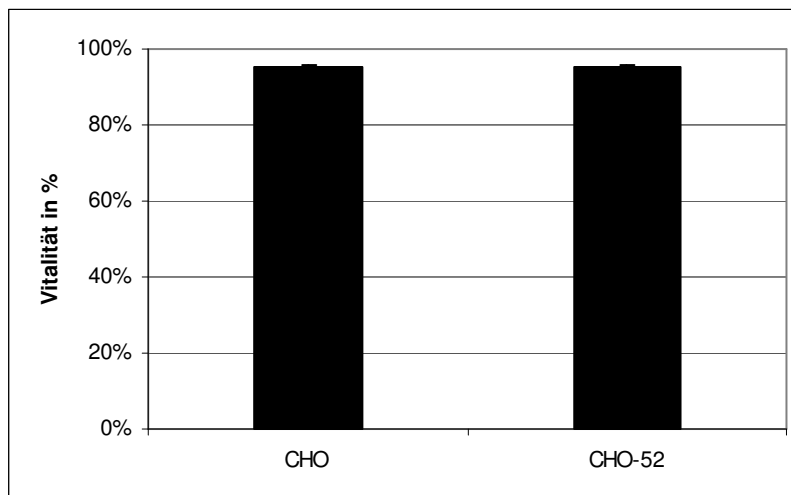
### 3 Ergebnisse

Uns dienten hauptsächlich FACS und Western Blot Analysen zur Untersuchung der Apoptose-Antwort in Syncytin-1 überexprimierenden CHO-, in scheintransfizierten CHO-, BeWo- Zellen und Trophoblasten.

#### 3.1 Vitalität

Zuerst haben wir die Vitalitätsraten der CHO und CHO-52-Zellen unter normoxischen Bedingungen untersucht. Dabei konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zellpopulationen in der Vitalität ausmachen. Für die CHO-52-Zellen lag sie im Durchschnitt bei  $95 \pm 1\%$  und für die CHO-Zellen bei  $95 \pm 1\%$ .

**Abbildung 3.1:** Vitalität der CHO- und CHO-52 Zellen unter normoxischen Bedingungen



Im Anschluss untersuchten wir die Einflüsse, die Hypoxie (z.B. 1% O<sub>2</sub>, 48h) auf die beiden Zellpopulationen ausübt. Dabei wurde deutlich, dass die CHO-52- Zellen erheblich resistenter gegenüber dem Sauerstoffmangel waren als die CHO-Zellen (Vitalität  $82 \pm 3\%$  für CHO-52 im Vergleich zu  $73 \pm 0\%$  für CHO).

Eine Stimulation der Zellen mit 8-Bromo-cAMP oder Forskolin konnte diesen Effekt nicht reduzieren, sowie auch keine veränderte Apoptose-Antwort nachgewiesen werden konnte.

Der gleiche Versuchsaufbau diente uns für Experimente an BeWo Zellen und humanen Trophoblasten. Dabei konnten wir zeigen, dass diese Zellen ganz ähnliche Vitalitätsraten aufwiesen. Im Durchschnitt lag diese bei  $82 \pm 2\%$  unter Normoxie und bei  $81 \pm 5\%$  unter Hypoxie. Auch hier konnte die Stimulation des cAMP pathways keine Veränderungen in der Apoptose-Antwort herbeiführen.

Durch die FACS Analyse konnten wir bedeutende Unterschiede in der Vitalität zwischen den beiden Zellpopulationen aufdecken.

Wie bereits erwähnt, variierten wir die Staurosporin Konzentrationen und die Inkubationszeiten.

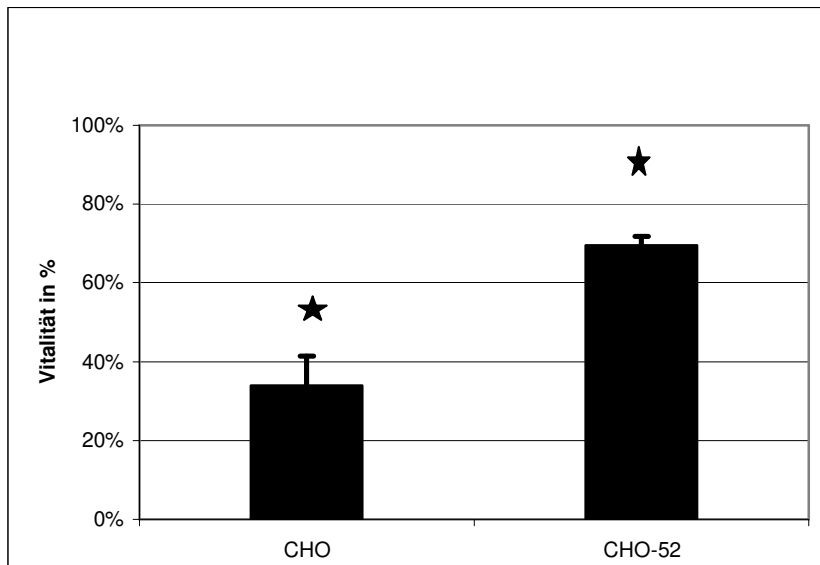
Wir haben mit 6h Versuchen und einer Staurosporin Konzentration von 500nM und 1µM begonnen, wobei hier die Differenzen zwischen CHO-52-Zellen und CHO-Zellen nicht deutlich waren.

Im Anschluss veränderten wir die Inkubationszeit. Sie sollte in den nun folgenden Versuchen 12h betragen. Wir setzten eine Konzentration von 500nM und 1µM Staurosporin ein.

Die längere Inkubation hatte zur Folge, dass der proapoptotische Stimulus (= Staurosporin) die Vitalitätsrate bei CHO-52-Zellen weniger senkt, als die der CHO-Zellen.

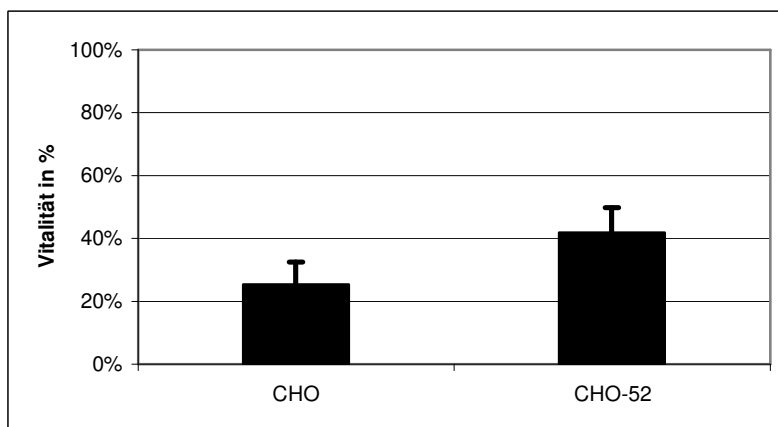
Im Detail stellte sich dies folgendermaßen dar: Nach einer 12-stündigen Behandlung der Zellen mit 500nM Staurosporin lebten noch  $69 \pm 2\%$  CHO-52-Zellen im Vergleich zu  $34 \pm 8\%$  der CHO-Zellen.

**Abbildung 3.2:** Vitalität der CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin für 12h, \*:p< 0,05



Dieser Effekt war noch ausgeprägter bei einer Staurosporin Konzentration von 1 $\mu$ M. Hierbei waren noch  $42 \pm 8\%$  der CHO-52-Zellen und  $25 \pm 7\%$  der CHO-Zellen am Leben.

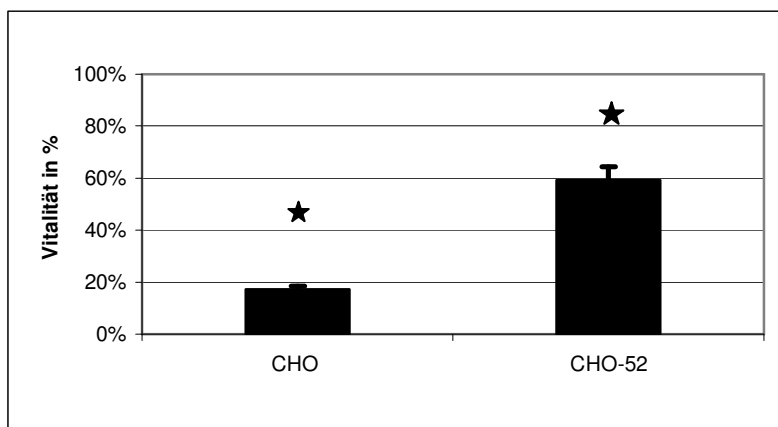
**Abbildung 3.3:** Vitalität der CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 1 $\mu$ M Staurosporin für 12h



Uns interessierte, ab welcher Inkubationszeit kein Unterschied mehr zwischen den beiden Zellpopulationen besteht, das heißt, ab wann Syncytin-1 keinen anti-apoptotischen Effekt mehr ausüben kann. Dazu erhöhten wir die Inkubationszeit erneut. In den folgenden Versuchen wurden die Zellen über einen Zeitraum von 18h mit Staurosporin inkubiert. Dabei war der Unterschied im Apoptoseverhalten noch ausgeprägter.

Es zeigten sich bei einer Konzentration von 500nM Staurosporin nach 18h  $60 \pm 5\%$  lebende CHO-52-Zellen im Gegensatz zu  $17 \pm 1\%$  bei den CHO-Zellen.

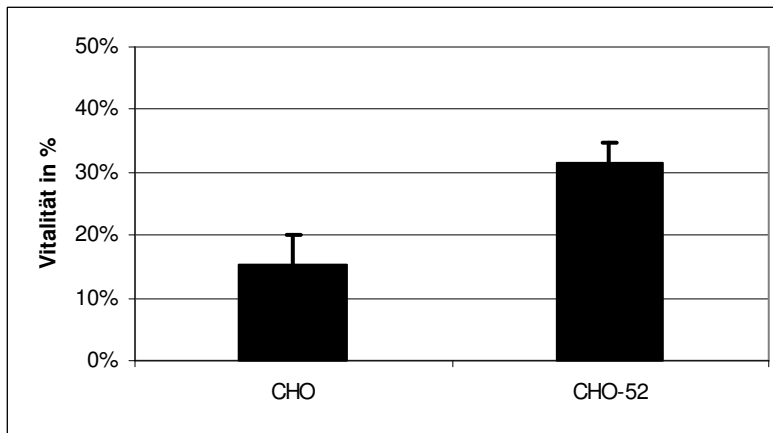
**Abbildung 3.4:** Vitalität der CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin für 18h, \*:p< 0,05



Eine Inkubation von 24h hat ebenfalls noch sehr ausgeprägte Effekte in der Vitalitätsrate der beiden Zellpopulationen hervorgebracht.

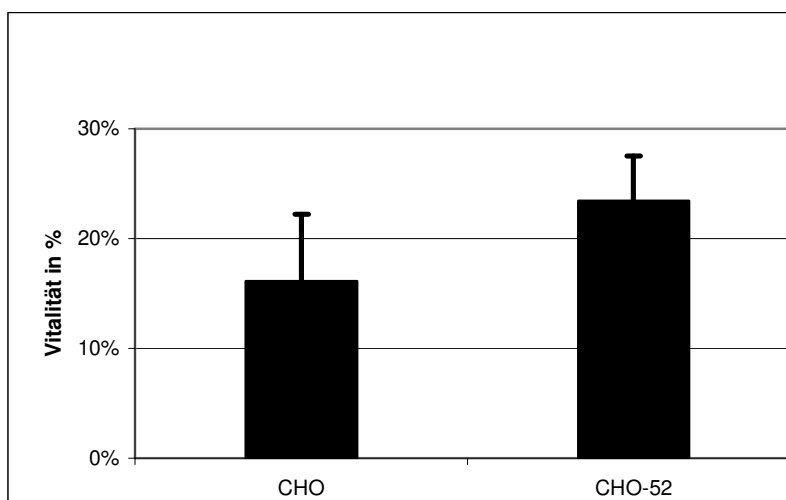
Bei 500nM Staurosporin lebten noch  $32 \pm 3\%$  der CHO-52-Zellen, hingegen nur noch  $15 \pm 5\%$  der CHO-Zellen.

**Abbildung 3.5:** Vitalität der CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin für 24h



Erstaunlicherweise führte die Konzentration von 1 $\mu$ M Staurosporin über 24h noch zu Unterschieden. Es konnte eine Vitalitätsrate von  $23 \pm 4\%$  bei den CHO-52-Zellen gezeigt werden, die bei den CHO-Zellen betrug noch  $16 \pm 6\%$ .

**Abbildung 3.6:** Vitalität der CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 1 $\mu$ M Staurosporin für 24h



Nachdem wir eine Reihe von Versuchen an unserem CHO-Zellkulturmodell für Syncytin-1 durchgeführt hatten, interessierte es uns, wie sich primäre humane Trophoblasten gegenüber dem Einfluss von Staurosporin verhalten. Diese sind bekannter Weise sehr empfindlich gegenüber exogenen Einflüssen, und es war nicht verwunderlich, dass sich die Vitalitätsrate im Durchschnitt um die 1-7% belief.

Die Behandlung der BeWo-Zellen mit 1µM Staurosporin für 6h führte zu folgenden Ergebnissen: Im Durchschnitt lag die Vitalitätsrate bei  $3 \pm 1\%$ . Längere Inkubationszeiten führten zu ähnlichen Ergebnissen.

### **3.2 Bcl-2**

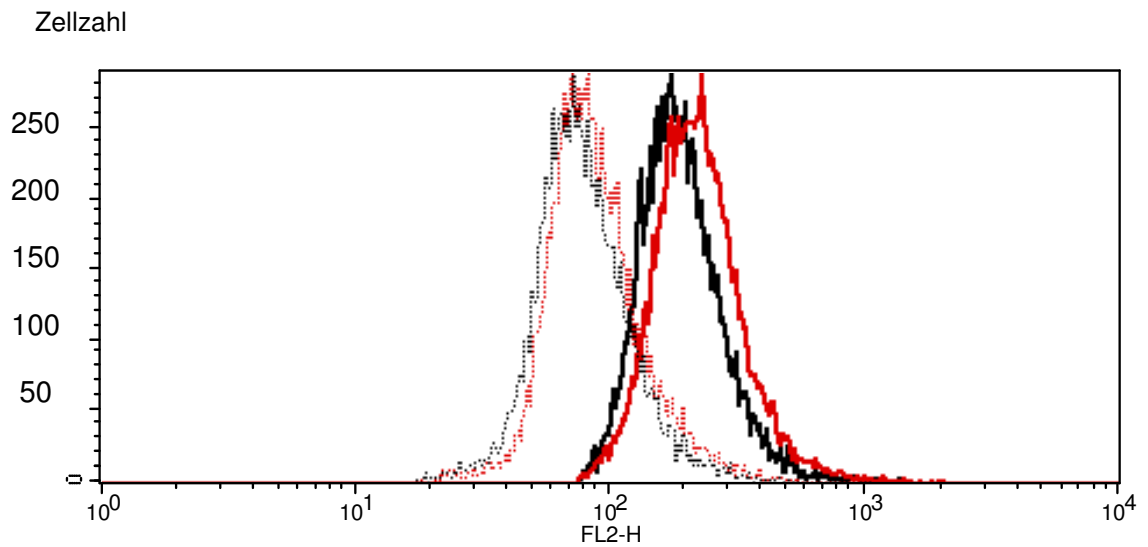
Durch unsere Experimente sollten mögliche Mechanismen identifiziert werden, die dem anti-apoptotischen Verhalten von Syncytin-1 überexprimierenden CHO-Zellen zugrunde liegen.

Eine erhöhte Expression von Bcl-2 in Syncytin-1 überexprimierenden CHO-Zellen konnte gezeigt werden.

Bei der Anti-Bcl-2-Färbung konnte bei unbehandelten CHO-52-Zellen eine höhere Fluoreszenz Intensität nachgewiesen werden im Vergleich zu unbehandelten CHO-Zellen.

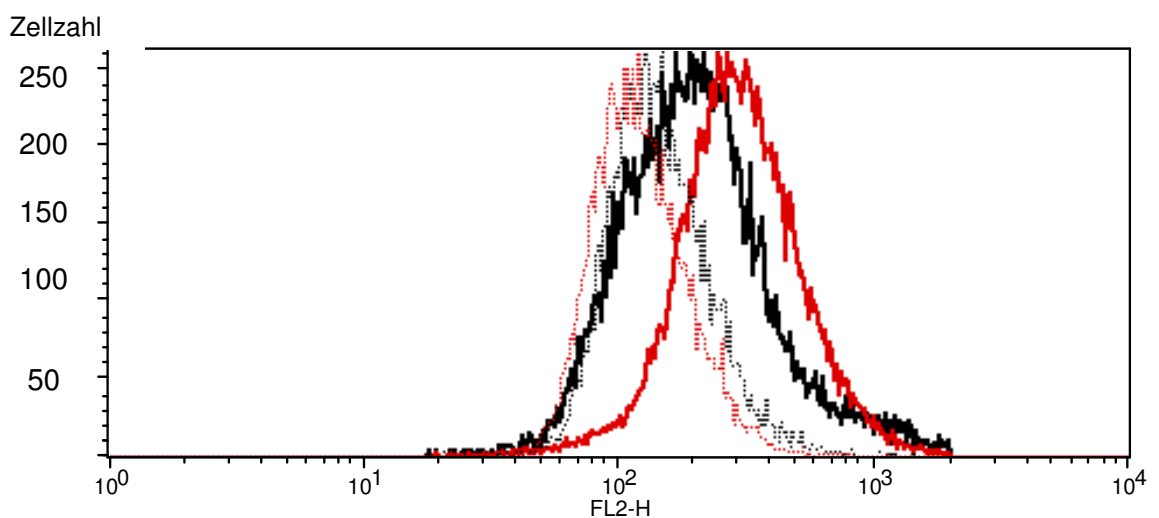


**Abbildung 3.7:** FACS Analyse zur Bcl-2 Expression in CHO (schwarz) und CHO-52 (rot) Zellen ohne Apoptosestimulus



Bei der Staurosporin-Behandlung der beiden Zellpopulationen mit 500nM für 18h zeigte sich bei den CHO-52-Zellen ein höheres Fluoreszenzsignal für Bcl-2 als bei den CHO-Zellen.

**Abbildung 3.8:** FACS Analyse zur Bcl-2-Expression in CHO- (schwarz) und CHO-52 (rot) Zellen nach der Inkubation mit 500nM STS für 18h



Legende zu Abbildung 3.7 und 3.8:

FACS Analyse der Bcl-2 Expression in CHO und CHO-52 Zellen. Zellschutt wurde durch das Setzen eines Gates um die sichtbaren Populationen aus

der Analyse ausgeschlossen. Die x-Achse repräsentiert die Fluoreszenz Intensität von Propidiumiodid (FL2-H), die y-Achse die Zellzahl. Die Zellen wurden ohne Apoptosestimuli (Abb. 3.7) und mit 500nM STS für 18h behandelt (Abb. 3.8)

Schwarze Linie (gepunktet): CHO Zellen, Autofluoreszenz Kontrolle

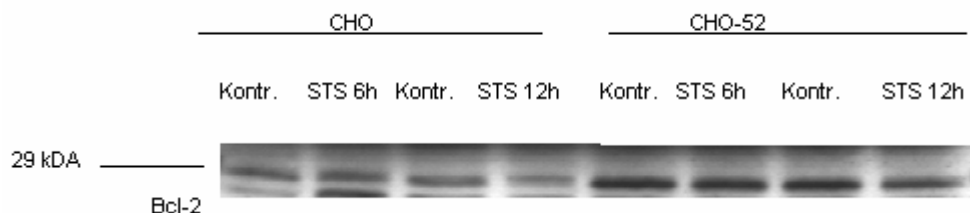
Rote Linie (gepunktet): CHO-52 Zellen, Autofluoreszenz Kontrolle

Schwarze Linie (durchgezogen): CHO Zellen, Kontrolle (Abb. 3.7), CHO Zellen nach der Inkubation mit 500nM STS für 18h (Abb. 3.8)

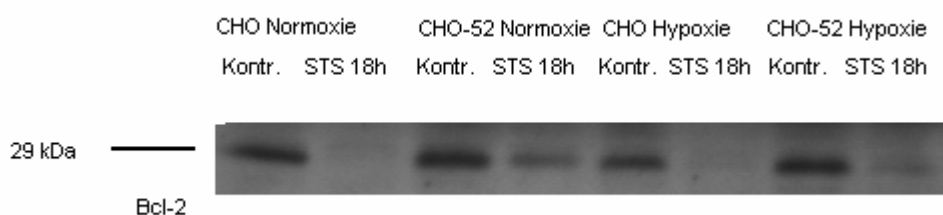
Rote Linie (durchgezogen): CHO-52 Zellen, Kontrolle (Abb. 3.7), CHO-52 Zellen nach der Inkubation mit 500nM STS für 18h (Abb. 3.8)

Um die höheren Bcl-2-Expressionen der CHO-52-Zellen zu verdeutlichen, wurden Western Blots angefertigt, die dies bestätigen sollten.

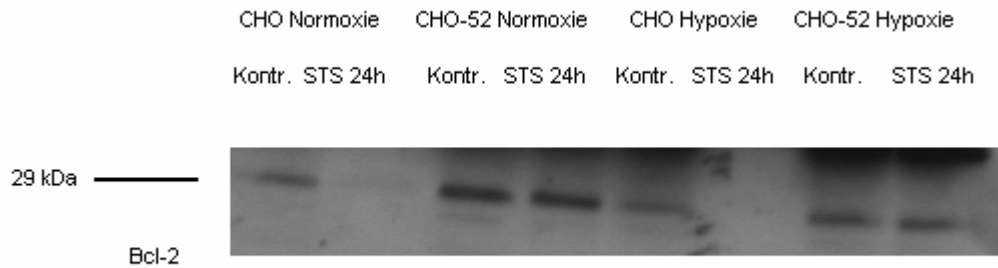
**Abbildung 3.9:** Bcl-2 Western Blot mit CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin für 6h und 12h



**Abbildung 3.10:** Bcl-2 Western Blot mit CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin und 1% Hypoxie für 18h



**Abbildung 3.11:** Bcl-2 Western Blot mit CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin und 1% Hypoxie für 24h

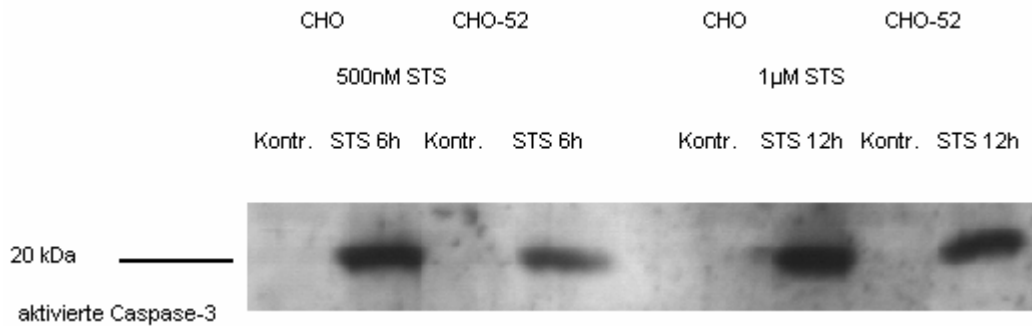


In allen drei gezeigten Western Blots wird deutlich, dass die Bcl-2-Levels bei den CHO-52-Zellen erheblich höher sind als bei den CHO-Zellen. Durch die Zugabe des Apoptoseinduktors Staurosporin wird dieser Effekt abgemildert. Der Einfluss von Hypoxie nach der Gabe von Staurosporin lässt die Bcl-2 Levels weiter absinken. Bei 1% O<sub>2</sub> und 500nM Staurosporin über 24h ist bei den CHO- Zellen keine Bande mehr sichtbar, wohingegen bei den CHO-52-Zellen noch eine schwache Bande erkennbar ist.

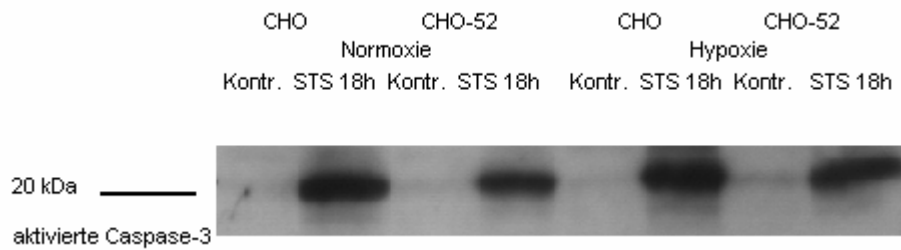
### 3.3 Caspasen

Eine herabgesetzte Aktivierung von Caspase-3, die bei den Syncytin-1 überexprimierenden Zellen für das anti-apoptotische Verhalten zuständig ist, könnte ein weiterer in Frage kommender Mechanismus sein. Dazu haben wir eine Reihe von Western Blot Analysen durchgeführt. Wir untersuchten, inwieweit unterschiedliche Inkubationszeiten und Staurosporin Konzentrationen von 500nM und 1µM die Caspase-3-Levels verändern.

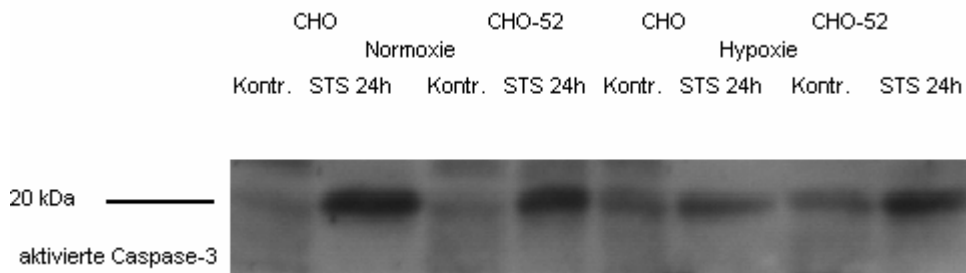
**Abbildung 3.12:** Caspase-3 Western Blot mit CHO- und CHO-52 Zellen nach Behandlung mit 500nM und 1µM Staurosporin für 6h und 12h



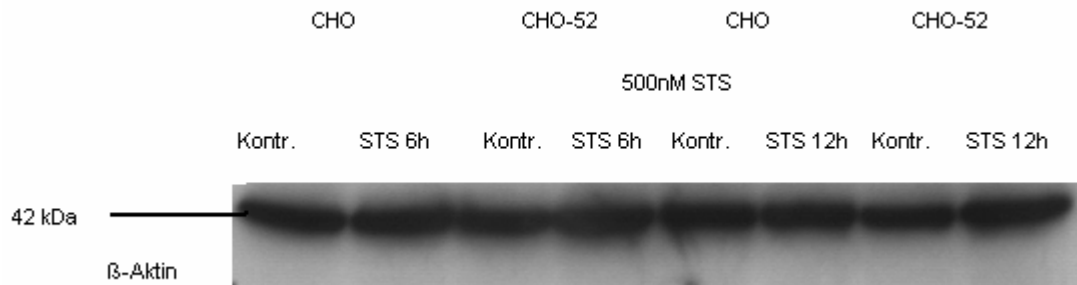
**Abbildung 3.13:** Caspase-3 Western Blot mit CHO- und CHO-52 Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin und 1% Hypoxie für 18h



**Abbildung 3.14:** Caspase-3 Western Blot mit CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin und 1% Hypoxie für 24h



**Abbildung 3.15:**  $\beta$ -Aktin Western Blot mit CHO- und CHO-52-Zellen nach Behandlung mit 500nM Staurosporin für 6h und 12h



Der hier gezeigte  $\beta$ -Aktin-Blot steht exemplarisch für alle angefertigten, die bei sämtlichen Versuchen als Ladekontrolle mitliefen.

Bei allen drei gezeigten Western Blots erkennt man, dass die aktive Form der Effektor Caspase-3 in CHO-52-Zellen nach Behandlung mit Staurosporin sich auf einem geringeren Niveau bewegt, als bei den CHO-Zellen. In Abbildung 3.12 erkennt man deutlich, dass auch die Konzentration von Staurosporin eine entscheidende Rolle spielt.

Bei den Kontrollen sind unter Normoxie keine Banden sichtbar. Unter Hypoxie zeigen sich bei den Kontrollen schwache Banden.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Syncytin-1 und Apoptose**

Wir testeten die Hypothese, ob Syncytin-1 über anti-apoptotische Eigenschaften verfügt und so zu einer veränderten Apoptoseantwort führt. Das heißt, wir untersuchten, ob CHO-Zellen nach der stabilen Transfektion mit Syncytin-1 im Vergleich zu den scheintransfizierten Zellen resistenter gegenüber der Apoptoseinduktion sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Syncytin-1 überexprimierende CHO-Zellen eine veränderte Apoptoseantwort auf Apoptosestimuli, wie die Inkubation mit Staurosporin, einem Proteinkinase-Inhibitor, zeigen. Anhand unserer FACS und Western Blot Analysen konnten wir nachweisen, dass die durch Staurosporin induzierte Apoptose bei den CHO-52-Zellen deutlich reduziert war, im Gegensatz zu den scheinbehandelten Zellen. Im Durchschnitt zeigten sich die Syncytin-1-transfizierten Zellen 2-3mal resistenter gegenüber der Apoptoseinduktion als die CHO-Zellen.

Es wurden Caspase-3 und Bcl-2 Western Blots angefertigt, sowie die Bcl-2 Konzentrationen und die Vitalität der beiden Zellpopulationen per FACS bestimmt.

Die deutlich höheren Bcl-2-Expressionen in den CHO-52-Zellen konnten wir anhand unserer Western Blot und FACS-Analysen zeigen.

Desweiteren konnte anhand unserer Caspase-3 Western Blots gezeigt werden, dass die Caspase-3 in den CHO-52-Zellen reduziert vorliegt. Die Caspase-3 ist eine Effektor-Caspase, die nach Aktivierung irreversibel zum Zelltod führt. Die bisherigen Daten sprechen dafür, dass Bcl-2 ein bedeutender Inhibitor der Caspase-3 ist (Hengartner and Horvitz 1994). Dies passt gut zu unseren Ergebnissen, denn Bcl-2 liegt in den CHO-52-Zellen vermehrt vor, wodurch die Caspase-3 verstärkt blockiert wird.

### **4.2 Syncytiale Fusion**

Es wird angenommen, dass Syncytin-1 eine entscheidende Rolle bei der Syncytiumbildung und bei Zellfusionsprozessen während der

Plazentogenese spielt (Blond et al. 1999; Mi et al. 2000; Knerr et al. 2005). Es kann nicht als der alleinige Mediator für diese betrachtet werden, nachdem Syncytin-1 von einem HERV stammt und dieses in einigen Säugetieren fehlt. Vielmehr kann Syncytin-1 als ein Repräsentant der Evolutionsstrategie betrachtet werden, was vielleicht zu den Vorteilen der tiefen Implantation während der humanen Schwangerschaft führte.

Die humane plazentare Syncytialisation ist ein komplexer Vorgang, an dessen Initiation in einem adäquaten Sauerstoffmilieu neben Syncytin, zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie z.B. GCMA, Membranbestandteile wie integrale Proteine und zelluläre Komponenten wie der Aminosäuretransporter ASCT2 beteiligt sind (Knerr et al. 2003).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Stimulation des cAMP-Signalwegs zu einer transkriptionellen Hochregulierung von Syncytin führt, was eine fortschreitende Differenzierung zur Folge hat und letztlich in einer kontrollierten Zellfusion endet (Knerr et al. 2005).

Während der Differenzierung der Zytotrophoblastzellen wird mit der Expression von anti-apoptotischen Proteinen, wie Bcl-2, begonnen (Huppertz et al. 1998). Dadurch wird die Apoptose inhibiert, allerdings bleibt der genaue Mechanismus, derzeit noch ungeklärt (Reynolds et al. 1996).

Die syncytiale Fusion ist ein Prozess, der im Zusammenhang mit Membranveränderungen, wie dem Phosphatidylserinflip, und der Aktivität von Caspasen steht (Das et al. 2004). Eine besondere Bedeutung kommt dem Phosphatidylserinflip zu, der als Grundvoraussetzung für die syncytiale Fusion von Trophoblastzellen gilt (Katsuragawa et al. 1997).

Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, welches an der inneren Zellmembran lokalisiert ist und durch Fusionsprozesse oder Apoptose an die äußere Zellmembran befördert wird.

Mittels eines monoklonalen Anti-Phosphatidylserin-Antikörper konnte die Syncytienbildung an einer Chorioncarcinom-Zelllinie inhibiert werden (Adler et al. 1995).

Auch bei der Apoptose spielt der Phosphatidylserinflip eine entscheidende Rolle (Das et al. 2004).

In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Stadien der Apoptose mit Differenzierung und syncytialer Fusion korrelieren.

### **4.3 Anti-apoptotischer Einfluss von Syncytin-1**

Wir schlussfolgern, dass Syncytin-1 aufgrund unserer Ergebnisse über plazentare anti-apoptotische Eigenschaften verfügt. Allerdings ist auch bekannt, dass die Regulation der plazentaren Apoptose sehr wichtig für die zelluläre Homöostase während der Schwangerschaft ist.

Bei plazentaren Erkrankungen, wie der Präeklampsie, ist die Apoptose erhöht (Huppertz et al. 2006). Hieran wird deutlich, dass die physiologische und die pathophysiologische Bedeutung der Apoptose sehr eng zusammen liegen, denn einerseits ist ein bestimmtes Maß an Apoptose physiologisch, und im Gegensatz dazu steht die erhöhte Apoptoserate, z.B. bei der Präeklampsie (DiFederico et al. 1999; Myatt 2002).

Mit unseren Daten konnten wir den ersten Hinweis liefern, dass Syncytin-1 überexprimierende Zellen eine veränderte Apoptoseantwort auf Apoptosestimuli zeigen und über anti-apoptotische Eigenschaften verfügen. Die damit verbundenen Mechanismen, wie eine herabgesetzte Aktivierung von Caspase-3 und eine erhöhte Expression von Bcl-2 in den CHO-52-Zellen konnten wir weiter aufklären.

Weitere Studien müssen folgen, um die Effekte von Syncytin-1 bei der zellulären Syncytialisation in humanen Plazenten zu klären. Ein möglicher Ansatz wäre hierbei die Verwendung anderer Zelllinien, wie z.B. Ersttrimester-Zelllinien.



## 5 Literaturverzeichnis

1. (2000), Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 183, S1-S22
2. Adler RR, Ng AK and Rote NS, (1995), Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, *JAR. Biol Reprod*, 53, 905-910
3. Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA and Cross JC, (2000), The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat Genet*, 25, 311-314
4. Arends MJ and Wyllie AH, (1991), Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol*, 32, 223-254
5. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR, (2000), Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2, 469-475
6. Benirschke K and Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. 4th Ed., Springer, New York, 2000
7. Benirschke K and Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. Springer, New York, 2001
8. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N and Huppertz B, (2004), Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ*, 11, 90-98
9. Blond JL, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B and Mallet F, (1999), Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*, 73, 1175-1185

10. Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F and Cosset FL, (2000), An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74, 3321-3329
11. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM and Strasser A, (1999), Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 286, 1735-1738
12. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM and Cohen GM, (2000), Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*, 275, 6067-6070
13. Cain K, Brown DG, Langlais C and Cohen GM, (1999), Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*, 274, 22686-22692
14. Chen CP, Chen CY, Yang YC, Su TH and Chen H, (2004), Decreased placental GCM1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia. *Placenta*, 25, 413-421
15. Chen CP, Wang KG, Chen CY, Yu C, Chuang HC and Chen H, (2006), Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia. *BJOG*, 113, 152-158
16. Costas J, (2002), Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W. *Mol Biol Evol*, 19, 526-533
17. Cross JC, (2000), Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 105-113

18. Das M, Xu B, Lin L, Chakrabarti S, Shivaswamy V and Rote NS, (2004), Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast. *Placenta*, 25, 396-407
19. DiFederico E, Genbacev O and Fisher SJ, (1999), Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol*, 155, 293-301
20. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S and Orlandini SZ, (2000), Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 182, 41-49
21. Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, Blond JL, Bouton O, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D and Mallet F, (2003), Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*, 23, 3566-3574
22. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW and Fisher SJ, (1997), Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, 277, 1669-1672
23. Gifford R and Tristem M, (2003), The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes*, 26, 291-315
24. Goldman-Wohl D and Yagel S, (2002), Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol*, 187, 233-238
25. Gosseye S and Fox H, (1984), An immunohistological comparison of the secretory capacity of villous and extravillous trophoblast in the human placenta. *Placenta*, 5, 329-347
26. Harris JR, (2002), Placental endogenous retrovirus (ERV): structural, functional, and evolutionary significance. *BioAssays* 307-316

27. Hengartner MO and Horvitz HR, (1994), Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature*, 369, 318-320
28. Hoshina M, Boothby M and Boime I, (1982), Cytological localization of chorionic gonadotropin alpha and placental lactogen mRNAs during development of the human placenta. *J Cell Biol*, 93, 190-198
29. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F and Kaufmann P, (1998), Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*, 110, 495-508
30. Huppertz B, Kadyrov M and Kingdom JC, (2006), Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol*, 195, 29-39
31. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G and Penninger JM, (2001), Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-554
32. Katsuragawa H, Kanzaki H, Inoue T, Hirano T, Mori T and Rote NS, (1997), Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits in vitro human trophoblastic hormone production and invasion. *Biol Reprod*, 56, 50-58
33. Keith JC, Jr., Pijnenborg R and Van Assche FA, (2002), Placental syncytin expression in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 187, 1122-1123; author reply 1123-1124
34. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang-Feng TL, Leibach FH and Ganapathy V, (1996), Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem*, 271, 18657-18661

35. Kerr JF, Winterford CM and Harmon BV, (1994), Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026
36. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR, (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257
37. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB and Brosens I, (1986), Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*, 93, 1049-1059
38. Kingdom JC and Kaufmann P, (1999), Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol*, 474, 259-275
39. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM and Strauss JF, 3rd, (1986), Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118, 1567-1582
40. Knerr I, Beinder E and Rascher W, (2002), Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 186, 210-213
41. Knerr I, Meißner U and Hashemolhosseini S, (2005), Syncytin-1 and GCMA: Key regulators in human placental physiology and pre-eclampsia. *Curr Women's Health Rev* 161-168
42. Knerr I, Schnare M, Hermann K, Kausler S, Lehner M, Vogler T, Rascher W and Meissner U, (2007), Fusiogenic endogenous-retroviral syncytin-1 exerts anti-apoptotic functions in staurosporine-challenged CHO cells. *Apoptosis*, 12, 37-43
43. Knerr I, Weigel C, Linnemann K, Dotsch J, Meissner U, Fusch C and Rascher W, (2003), Transcriptional effects of hypoxia on fusiogenic syncytin and its receptor ASCT2 in human

cytotrophoblast BeWo cells and in ex vivo perfused placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol*, 189, 583-588

44. Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA and Kingdom JC, (1996), Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am J Obstet Gynecol*, 175, 1534-1542
45. Kudo Y and Boyd CA, (1990), Characterization of amino acid transport systems in human placental basal membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1021, 169-174
46. Kudo Y and Boyd CA, (2002), Human placental amino acid transporter genes: expression and function. *Reproduction*, 124, 593-600
47. Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL and Redman CW, (2003), Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochim Biophys Acta*, 1638, 63-71
48. Kurman RJ, Main CS and Chen HC, (1984), Intermediate trophoblast: a distinctive form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features. *Placenta*, 5, 349-369
49. Laemmli UK, (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
50. Lavillette D, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL and Kabat D, (2002), The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol*, 76, 6442-6452
51. Lee X, Keith JC, Jr., Stumm N, Moutsatsos I, McCoy JM, Crum CP, Genest D, Chin D, Ehrenfels C, Pijnenborg R, van Assche FA and

- Mi S, (2001), Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia. *Placenta*, 22, 808-812
52. Levy R and Nelson DM, (2000), To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. *Placenta*, 21, 1-13
53. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X, (1997), Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-489
54. Li WH, Gu Z, Wang H and Nekrutenko A, (2001), Evolutionary analyses of the human genome. *Nature*, 409, 847-849
55. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X, (1998), Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-490
56. Lyall F, Bulmer JN, Duffie E, Cousins F, Theriault A and Robson SC, (2001), Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol*, 158, 1713-1721
57. Mallet F, Bouton O, Prudhomme S, Cheynet V, Oriol G, Bonnaud B, Lucotte G, Duret L and Mandrand B, (2004), The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1731-1736
58. Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, Jr. and McCoy JM, (2000), Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403, 785-789
59. Morrish DW, Dakour J and Li H, (2001), Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human

syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal. *Curr Protein Pept Sci*, 2, 245-259

60. Myatt L, (2002), Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*, 19, 103-111
61. Myers JE and Baker PN, (2002), Hypertensive diseases and eclampsia. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 14, 119-125
62. Nicholson DW and Thornberry NA, (1997), Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22, 299-306
63. Nunez G, Benedict MA, Hu Y and Inohara N, (1998), Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17, 3237-3245
64. Ponferrada VG, Mauck BS and Wooley DP, (2003), The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol*, 148, 659-675
65. Rasko JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I and Miller AD, (1999), The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2129-2134
66. Reynolds JE, Li J, Craig RW and Eastman A, (1996), BCL-2 and MCL-1 expression in Chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp Cell Res*, 225, 430-436
67. Rote NS, Chakrabarti S and Stetzer BP, (2004), The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta*, 25, 673-683
68. Schild RL, Schaiff WT, Carlson MG, Cronbach EJ, Nelson DM and Sadovsky Y, (2002), The activity of PPAR gamma in primary human trophoblasts is enhanced by oxidized lipids. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1105-1110



69. Searle J, Kerr JF and Bishop CJ, (1982), Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 17 Pt 2, 229-259
70. Sibai BM, (1992), Hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 19, 615-632
71. Sibai BM, Caritis S and Hauth J, (2003), What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol*, 27, 239-246
72. Slee EA, Adrain C and Martin SJ, (2001), Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320-7326
73. Smallwood A, Papageorgiou A, Nicolaidis K, Alley MK, Jim A, Nargund G, Ojha K, Campbell S and Banerjee S, (2003), Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted PEG10, and SGCE in human placenta. *Biol Reprod*, 69, 286-293
74. Sommerfelt MA, Williams BP, McKnight A, Goodfellow PN and Weiss RA, (1990), Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19. *J Virol*, 64, 6214-6220
75. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES, (1998), Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1, 949-957
76. Stennicke HR and Salvesen GS, (1998), Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*, 1387, 17-31
77. Stoye JP and Coffin JM, (2000), A provirus put to work. *Nature*, 403, 715, 717
78. Strasser A, Huang DC and Vaux DL, (1997), The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in

cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, 1333, F151-178

79. Tailor CS, Nouri A, Zhao Y, Takeuchi Y and Kabat D, (1999), A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses. *J Virol*, 73, 4470-4474
80. Takahashi A and Earnshaw WC, (1996), ICE-related proteases in apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 50-55
81. Thompson CB, (1995), Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462
82. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer SJ, (2001), Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-730
83. Yamada K, Ogawa H, Tamiya G, Ikeno M, Morita M, Asakawa S, Shimizu N and Okazaki T, (2000), Genomic organization, chromosomal localization, and the complete 22 kb DNA sequence of the human GCMa/GCM1, a placenta-specific transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, 134-139
84. Yu C, Shen K, Lin M, Chen P, Lin C, Chang GD and Chen H, (2002), GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem*, 277, 50062-50068
85. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X, (1997), Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90, 405-413

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASCT2	Natrium abhängiger Transporter für neutrale Aminosäuren, Syncytinrezeptor
BSA	bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure bzw. komplementäre DNA
CG	Choriongonadotropin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Env, env	Envelope (Hüllprotein oder sein Gen)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	forward scatter = Vorwärtsstreulicht
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GCMa	glial cell missing factor a
HELLP	hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count
HERV	humanes endogenes Retrovirus
IUGR	intrauterine growth restriction

kDa	Kilodalton
l	Liter
LINES	long interspersed elements
LTR	long terminal repeats
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ORF	open reading frames
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline = phosphat-gepufferte Salzlösung
pbs	primer binding site
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
pol	Polymerase (bzw. reverse Transkriptase bei Retroviren)
PS	Phosphatidylserin
rpm	rotations per minute (Umdrehungen/min)
RT	Raumtemperatur
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwertes (Standardfehler)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smac	second mitochondrial activator of caspases
SSC	side scatter= Seitwärtsstreulicht
STS	Staurosporin

TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U/ml	Einheiten pro Milliliter
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar

## 7 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

Knerr I, Schnare M, **Hermann K**, Kausler S, Lehner M, Vogler T, Rascher W and Meissner U, (2007), Fusiogenic endogenous-retroviral syncytin-1 exerts anti-apoptotic functions in staurosporine-challenged CHO cells. *Apoptosis*, 12, 37-43

## 8 Anhang

### 8.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Annexin V-FICT	Responsif, Erlangen
Aprotinin	Sigma, München
Bromphenolblau	Riedel-de Haen, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Coelbe
Glycerin	Sigma, München
Glycin	Sigma, München
Hygromycin B	PAA, Coelbe
Leupeptin	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, München
Milchpulver	Roth, Kalsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Sigma, München
Natriumdodecylsulfat 10% (SDS)	Serva, Karlsruhe
Nonidet-P40	Sigma, München
PBS	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin Lösung	Sigma, München
Pepstatin A	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Ponceau S	Sigma, München
Propidiumiodid	Sigma, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Röntgen-Entwicklerlösung	Tetenal, Norderstedt
Röntgen-Fixierlösung	Tetenal, Norderstedt

Staurosporin	Sigma, München
TEMED	Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, München
Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)	Sigma, München

## 8.2 Antikörper

**Tabelle 8.1:** Übersicht über die verwendeten Antikörper

<b>Name</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Anti- $\beta$ -Aktin	Ziege polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, USA
Anti-Caspase-3, active	Kaninchen	Sigma, München
Anti-Bcl-2	Kaninchen polyklonal	Delta Biolabs, Gilroy, CA, USA
<b>Peroxidase- konjugate</b>		
Anti-Goat IgG	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
Anti-Rabbit IgG	Ziege	Promega, Madison, Wi, USA



### 8.3 Fluoreszenzfarbstoffe

**Tabelle 8.2:** Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie

<b>Farbstoff</b>	<b>Anregungs- maximum</b>	<b>Emissions- maximum</b>
Fluorescein- isothiocyanat (FITC)	488nm	530nm
Propidiumiodid (PI)	488nm	620nm
Phycoerythrin (PE)	492nm	580nm

### 8.4 Verwendete Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Blotkammer (semi-dry electrophoresis system)	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Curix Röntgen Kassette	AGFA, Köln
Durchflußzytometer (FACS Calibur)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer (Vertical electrophoresis system)	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Magnetrührer	IKA® Works, Wilmington, NC, USA
Mikroskop	Nikon, Japan
Mini Rocker MR1	PEQ Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen

MS1 Minishaker	IKA® Works, Wilmington, NC, USA
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Power PAC 300 (Stromgeber für Elektrophorese)	BioRad, München
Power supply 2103 (Stromgeber fürs Blotten)	LKB, Wien
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge (Rotanta 96R)	Hettich, Tuttlingen

## **8.5 Puffer und Lösungen**

RIPA-Puffer

RIPA-Puffer(modifiziert)

TAE-Puffer

SDS-Probenpuffer

SDS-Sammelgelpuffer

SDS-Trenngelpuffer

Laemmli Elektrophorese Puffer

Ponceau S Lösung

Blocklösung für Western Blot

Stripping Puffer

Toubin-Blotpuffer, 1x

TBS-Puffer, 10x

TBS/T-Puffer

Annexin Binding Puffer

## 9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Rascher möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Ina Knerr. Sie ermöglichte es mir in ihrer Arbeitsgruppe zu arbeiten und war durch ihre intensive Betreuung eine stetige Ansprechpartnerin.

Desweiteren möchte ich mich bei Tina Vogler bedanken für die praktische Anleitung und Hilfe im Labor. Von ihr wurde freundlicherweise die Isolierung der Trophoblasten übernommen.

Bei meiner Mitdoktorandin S. Kausler möchte ich mich für die nette und gute Zusammenarbeit bedanken.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Hermann, Kathrin
Geburtsdatum	06.11.1978
Geburtsort	Mainz
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. med. Heiner Hermann, geb. am 14.09.1940 tödlich verunglückt am 26.03.1996 Ute Hermann, geb. am 11.01.1952

### Schulbildung

1985-1989	Grundschule, Nieder-Olm
1989-1995	Staatliche Realschule, Wörrstadt
1995-1998	Gymnasium am Kurfürstlichen Schloss, Mainz
22.06.1998	Abitur

### Berufsausbildung

1999-2002	Berufsfachschule für Ergotherapie, Freiburg Staatlich anerkannte Ergotherapeutin
-----------	---

### Universitärer Werdegang

2002-2008	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander- Universität, Erlangen- Nürnberg
30.03.2004	Ärztliche Vorprüfung
11.11.2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppO)

### Berufsausübung

seit 2.2.2009	Assistenzärztin im Bereich Gynäkologie und Geburtshilfe, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg, Klinik St. Hedwig
---------------	---