

Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

**Untersuchung der Transkriptionsmuster von HERV-W-*env* Loci bei
Patienten mit Multiper Sklerose sowie gesunden Kontrollen und
Analysen zur Herkunft von MSR_V Sequenzen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Georg Laufer
geb. am: 07.12.1982 in Saarlouis

Meiner Familie
in Dankbarkeit gewidmet

3	Material	36
	3.1 Bakterienstämme	36
	3.2 Größenmarker	36
	3.3 Chemikalien, Puffer und Medien	36
	3.4 Laborgeräte und andere Materialien	39
	3.4.1 Geräte	39
	3.4.2 Kits	39
	3.5 Enzyme und dNTP's	39
	3.6 Oligonukleotide	40
	3.7 Vektoren	41
	3.7.1 pGem-T-Vektor	41
	3.7.2 pCR 2.1-TOPO Vektor	41
	3.8 Zelllinien	41
	3.8.1 B-Zelllinien	41
	3.9 Klonierungen	42
	3.9.1 Herv-W- <i>env</i> Expressionsmusteranalyse	42
	3.9.2 Screening auf Mutationen im Herv-W- <i>env</i> Xq22.3 Stop Codon	42
	3.9.3 Weitere Klonierungen	43
	3.10 Computersoftware und Webseiten	43
4	Patienten und gesunde Kontrollen	44
5	Methoden	47
	5.1 Zellkulturtechniken	47
	5.1.1 Auftauen der PBMC – Proben	47
	5.1.2 Bestimmung der Zellzahl mittel des CASY-Zellzählers	47
	5.2 Nukleinsäuretechniken	47
	5.2.1 RNA Extraktion	47

6.2 Analyse in der Literatur beschriebener MSRV – Sequenzen	74
6.2.1 Analyse der MSRV- <i>env</i> Sequenzen	75
6.2.2 Analyse der MSRV- <i>gag</i> Sequenz	85
6.2.3 Herkunft der Volllängen MSRV- <i>pol</i> Sequenz	87
6.3 Orientierung der HERV-W-<i>env</i> Xq22.3 Transkripte	89
6.4 Screening auf Mutation im Stop-Codon des HERV-W-<i>env</i> Xq22.3 Locus	93
6.5 Identifikation eines neuen single nucleotide polymorphism (=SNP) im HERV-W-<i>env</i> Xq22.3 Locus	96
7 Diskussion	99
7.1 In humanen PBMC's transkribierte HERV-W-<i>env</i> Loci	100
7.1.1 Struktur der transkribierten HERV-W Loci	101
7.2 Herkunft rekombinierter Sequenzen	102
7.3 MSRV – exogenes Virus oder Artefakt?	103
7.3.1 Implikationen der Ergebnisse für den Status von MSRV	103
7.3.2 Alternative Erklärungsansätze für rekombinierte MSRV - Sequenzen	106
7.3.3 Bisherige Charakterisierung von MSRV	106
7.3.3.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von retrovirus-artigen Partikeln in Zellkulturen von Patienten mit MS	106
7.3.3.2 Reverse – Transkriptase Aktivität im Zellkulturüberstand von Patienten mit MS	107
7.3.3.3 Übertragung eines mutmaßlichen infektiösen Agens durch Kokultur zweier leptomeningealer Zelllinien	108
7.3.3.4 Amplifikation mutmaßlich partikelassoziiierter RNA mittels RT-PCR und degenerierten Primern	108
7.3.4 Fazit	109

7.3.5 Eine analoge Situation - "melanoma associated endogenous retrovirus"	110
7.4 Konsequenzen für die mögliche Rolle von MSRV / HERV-W bei der Pathogenese der MS	110
7.4.1 Mögliche Translation von HERV-W- <i>env</i> Xq22.3 Transkripten	110
7.4.2 HERV-W- <i>env</i> Xq22.3 Transkripte erfüllen die Voraussetzungen für eine Translation	111
7.4.3 Immunhistochemische Hinweise auf eine Expression von HERV-W- <i>env</i> Xq22.3 und HERV-W- <i>gag</i> 3q26.32	112
7.4.4 Ausbleiben einer Immunantwort gegen MSRV / HERV-W	113
7.5 Screening auf Mutation im Stop-Codons in HERV-W-<i>env</i> Xq22 Transkripten	114
7.5.1 Herkunft der Mutation im Stop-Codon des von genomischer DNA stammenden HERV-W- <i>env</i> Xq22.3 Klons MS-4-K2	114
7.5.2 Identifikation eines neuen single nucleotide polymorphism (= SNP) im HERV-W- <i>env</i> Xq22.3 Locus	115
7.6 Resümee	115
8 Literaturverzeichnis	117
9 Publikationen	127
10 Danksagung	128
11 Lebenslauf	129

II Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 S. 21 Schematischer Aufbau eines in die Wirts – DNA integrierten retroviralen Genoms
- Abb. 2 S. 22 Schematischer Replikationszyklus exogener Retroviren
- Abb. 3 S. 25 Phylogenetische Einteilung der Retroviren
- Abb. 4 S. 30 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von retrovirus – artigen HERV-K Partikeln
- Abb. 5 S. 58 Beispiel für die Mutationsanalyse einer rekombinierten Sequenz anhand eines Multiplen Alignments
- Abb. 6 S. 60 Agarosegel einer Kontroll – PCR zum Ausschluss von Verunreinigungen bei der cDNA Herstellung
- Abb. 7 S. 65 Multiples Alignment der Klonsequenzen MS-III-K11, KO-IV-K6 und KO-IV-K19 mit sieben in Frage kommenden Referenzsequenzen
- Abb. 8 S. 67 Beispiel einer nicht klar zuzuordnenden Mutation des Klones MS-IV-K7
- Abb. 9 S. 69 Übersicht über die Häufigkeit von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Nukleotidabweichungen zur Referenzsequenz vor und nach Annahme von Rekombinationsereignissen
- Abb. 10 S. 72 Klonierungsfrequenz der einzelnen HERV-W-*env* Loci bei vier gesunden Kontrollen
- Abb. 11 S. 73 Klonierungsfrequenz der einzelnen HERV-W-*env* Loci bei vier Patienten mit MS
- Abb. 12 S. 74 Whisker Boxplot zum Gruppenvergleich des prozentualen Anteils der einzelnen HERV-W Loci an den Transkripten von Patienten und Kontrollen
- Abb. 13 S. 76 Alignment der MSR_V – Sequenz AF127227 mit der entsprechenden genomischen Referenzsequenz auf Chr. 3q23
- Abb. 14 S. 82 Multiples Alignment der MSR_V-*env* Sequenzen AF331500 und AF127228 mit den an diesen Sequenzen beteiligten HERV-W Loci
- Abb. 15 S. 84 Multiples Alignment der MSR_V-*env* Sequenz AF127229 mit den, an dieser Sequenz beteiligten HERV-W Loci
- Abb. 16 S. 86 Alignment der MSR_V-*gag* Sequenz AF123881 mit der genomischen Referenzsequenz auf Chr 3q26.32

- Abb. 17 S. 89 Durch HERV-W Loci erklärbare Abschnitte der MSR_V-*pol* Sequenz AF009668
- Abb. 18 S. 90 Prinzip der Reversen Transkription mit für das Transkript spezifischen Primern
- Abb. 19 S. 91 Ergebnis der PCR auf die Produkte der Gen – spezifischen Reversen Transkription für HERV-W-*env* Xq22.3
- Abb. 20 S. 92 Alignment der Aminosäuresequenz des von der MSR_V Sequenz AF331500 codierten Env Proteins und des vom ORF auf Chr. Xq22.3 codierten HERV-W Env Proteins
- Abb. 21 S. 94 Multiples Alignment des Stop Codon enthaltenden Bereichs der HERV-W-*env* Loci auf Chromosom Xq22.3 bei 10 Patienten mit MS
- Abb. 22 S. 95 Multiple Alignment des Stop Codon enthaltenden Bereichs der HERV-W-*env* Loci auf Chromosom Xq22.3 bei 10 Kontrollen
- Abb. 23 S. 97 Multiples Alignment der Sequenzen aller Proben welche einen nicht-synonymen SNP im HERV-W-*env* Gen auf Chromosom Xq22 aufweisen

III Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1 S. 40 Übersicht über die für die PCR verwandten Oligonukleotidkombinationen
- Tab. 2 S. 42 Zuordnung der Klonierungen im Rahmen der HERV-W-*env* Transkriptionsmusteranalyse zu den dabei verwandten PBMC Proben
- Tab. 3 S. 43 Übersicht über die im Rahmen des Screenings auf Mutationen eines Stop Codons im HERV-W-*env* Xq22.3 Locus erfolgten Klonierungen und die dabei verwandten Proben
- Tab. 4 S. 45 Übersicht über die bekannten klinischen Daten des Patientenkollektivs und die Nomenklatur der mit den jeweiligen Proben durchgeführten Klonierungen
- Tab. 5 S. 46 Übersicht über Alter und Geschlecht der Kontrollpersonen sowie die Nomenklatur der mit den jeweiligen Proben durchgeführten Klonierungen
- Tab. 6 S. 49 Pippetierschema DNase Verdau, DNase I, Roche
- Tab. 7 S. 49 Pippetierschema DNase Verdau, Turbo DNase, Ambion
- Tab. 8 S. 50 Pippetierschema Reverse Transkription
- Tab. 9 S. 52 Pippetierschema PCR – Ansatz
- Tab. 10 S. 55 Pippetierschema pGEM-Ligation
- Tab. 11 S. 55 Pippetierschema Topo-Ligation
- Tab. 12 S. 62 Übersicht der bei der Transkriptionsmusteranalyse von den Primern theoretisch erfassten als auch tatsächlich nachgewiesenen HERV-W Loci
- Tab. 13 S. 66 Übersicht über die Anzahl rekombinierter und nicht-rekombinierter Sequenzen, die Zahl der jeweils daran beteiligten Herkunftsloci sowie die Anzahl der insgesamt für die Auswertung berücksichtigten Klone
- Tab. 14 S. 70 Übersicht über den prozentualen Anteil der transkriptionsaktiven HERV-W-*env* Loci im humanen Genom an den nicht – rekombinierten und rekombinierten Klonen sowie den Anteil an den gesamten gewerteten Klonen
- Tab. 15 S. 98 Übersicht über die Anzahl der Sequenzen im Kontroll und Patientenkollektiv welche den neu beschriebenen SNP im HERV-W-*env* Gen auf Chromosom Xq22 aufweisen

IV Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
μ	micro-
γ	delta
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ALV	avian leucosis virus
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BFV	bovine foamy virus
BLCL	B – lymphoblastoide Zelllinie
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CA	Kapsidprotein
<i>cpol</i>	consensus pol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
E. coli	Escherischia coli
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIAV	equine infectious anemia virus
<i>env</i>	für das Envelope Protein kodierendes Gen
Env	Envelope Protein
FCS	fötales Kälberserum
FeLV	feline leukemia virus
FFV	feline foamy virus
FIV	feline immunodeficiency virus

Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
G	Guanin
<i>gag</i>	„Gruppenspezifisches Antigen“, für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine kodierendes Gen eines Retrovirus
Gag	Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine eines Retrovirus
GALV	gibbon ape leukemia virus
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus der Familie K
HERV-W	Humanes endogenes Retrovirus der Familie W
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HTLV-1 bzw. 2	Humanes T-Zell Leukämie Virus 1 bzw. 2
JRSV	Jaagsiekte sheep retrovirus
kb / kbp	Kilobasen / Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Broth
LTR	long terminal repeat
MA	membranassoziierte Domäne
m	milli-
MHR	major homology region
min	Minute
MMTV	mouse mammary tumor virus
MLV	murine leukemia virus
MVV	Maedi-Visna virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
M	männlich / Molar
MERV	melanoma associated endogenous retrovirus
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sklerose assoziiertes Retrovirus
n	nano-
NC	Nucleocapsid Protein
N-terminal	Amino – terminal
ORF	offener Leserahmen

Abkürzungsverzeichnis

PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PERV	porcine endogenous retrovirus,
<i>pol</i>	für Protease, Reverse Transkriptase und Integrase eines Retrovirus kodierendes Gen
PP	primary progressive (primär progredient)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RR	relapsing remitting (schubförmig remittierend)
RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
SAG	Superantigen
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SFV	simian foamy virus
SIV	simian immunodeficiency virus
SNP	single nucleotide polymorphism
SnRV	simian endogenous retrovirus
SP	secondary progressive (sekundär progredient)
SRV	simian retrovirus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TH	T-Helferzelle
TM	transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	ultra – violett
V	Volt
W	weiblich
WDSV	walleye dermal sarcoma virus
X	Stop Codon
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1 Zusammenfassung & Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die Ätiologie der MS ist bislang ungeklärt, jedoch spielen in ihrer Entstehung sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Hierbei wird auch eine Beteiligung von Retroviren diskutiert. Retrovirus-ähnliche Partikel, die reverse Transkriptase Aktivität enthalten, wurden erstmals 1989 in einer leptomeningealen Zelllinie von einer Patientin mit MS beschrieben. Nachdem später Partikel-assoziierte retrovirale Sequenzen aus Zellkulturüberständen und dem Plasma von Patienten mit MS amplifiziert werden konnten, wurden diese als MS-assoziiertes Retrovirus (MSRV) bezeichnet. Kurz darauf stellte sich heraus, dass MSRV Sequenzen eng verwandt mit einer neuen Familie humaner endogener Retroviren (HERV-W) sind. HERVs sind stabil in die menschliche DNA integrierte retrovirale Sequenzen, machen ungefähr 8% des humanen Genoms aus und gehen auf Infektionen der Keimbahn durch exogene Retroviren im Verlauf der Evolution zurück.

Verschiedene Studien erbrachten starke Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Relevanz des MSRV Envelope (Env) Proteins sowie eines von einer HERV-W Kopie auf Chr. 7q21.2 enkodierten Env Proteins (Syncytin-1) bei der MS. Nichtsdestotrotz war die exakte Beziehung zwischen MSRV und HERV-W bislang unklar. Handelt es sich bei MSRV um ein exogenes Retrovirus, das mit einer endogenen Retrovirus-Familie eng verwandt ist? Könnte MSRV alternativ auf endogene HERV-W Sequenzen zurückgehen? Ist MSRV überhaupt ein unabhängiges replikationskompetentes Retrovirus?

Wäre MSRV ein mit der MS-assoziiertes exogenes Retrovirus, sollten sich bei Patienten mit MS spezifisch MSRV-*env* RNA Transkripte nachweisen lassen. Allerdings besitzen jedoch auch 13 der über 100 HERV-W Loci im humanen Genom Vollängen *env* Gene, welche ebenfalls RNA Transkripte produzieren könnten und somit den Nachweis von MSRV-*env* erschweren. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit untersucht, welche HERV-W-*env* Loci in mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen transkriptionsaktiv sind und ob bei Patienten mit MS spezifisch MSRV-*env* RNA Transkripte nachweisbar sind.

Mittels RT-PCR mit degenerierten Primern wurden MSR/HERV-W-*env* mRNA Transkripte von vier Patienten mit MS und vier gesunden Kontrollen amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen (n = 332) wurden anschließend anhand charakteristischer Sequenzunterschiede zwischen einzelnen HERV-W-*env* Loci individuellen HERV-W Proviren im humanen Genom zugeordnet. Hierdurch konnten insgesamt 7 transkriptionsaktive HERV-W-*env* Loci in humanen PBMC's identifiziert werden, darunter auch der Syncytin-1 Locus auf Chromosom 7q21.2. Interessanterweise weisen bis auf den Syncytin-1 Locus alle anderen 6 transkriptionsaktiven HERV-W-*env* Loci die Struktur prozessierter Pseudogene ohne erhaltenen viralen Promotor auf. Hinsichtlich der Transkriptionsaktivität der einzelnen Proviren bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Überraschenderweise ergab eine detaillierte Analyse der sequenzierten Klone mittels multipler Alignments jedoch einen relativ hohen Anteil (ca. 30 %) von am ehesten *ex-vivo* entstandenen Rekombinationen zwischen unterschiedlichen HERV-W-*env* Loci.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden die bisher in der Literatur beschriebenen MSR Sequenzen re-analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle sog. MSR Sequenzen entweder auf einzelne (transkriptionsaktive) HERV-W Loci oder aber Rekombinationen zwischen HERV-W Loci zurückgehen.

Interessanterweise weist ein HERV-W-*env* Locus auf Chr. Xq22.3, welcher maßgeblich an den MSR-*env* Sequenzen beteiligt ist, einen offenen Leserahmen für ein 475 Aminosäuren großes Env Protein auf. Durch eine orientierungsspezifische reverse Transkription wurde gezeigt, dass die Transkripte dieses HERV-W Locus eine für eine mögliche Proteinsynthese korrekte Orientierung besitzen. Im Gegensatz zum Vollängen HERV Env Protein ist das Xq22.3 HERV-W Env Protein durch ein Stop-Kodon N-terminal trunziert. Exakt dieses Stop Kodon ist bei einem der bislang beschriebenen MSR-*env* Klone mutiert, so dass dieser Klon für ein Vollängen Env Protein kodiert. Bei einer Untersuchung von genomischer DNA von 10 Patienten mit MS und 10 gesunden Kontrollen wurde eine mit diesem MSR Klon identische Mutation, welche das Stop-Kodon im HERV-W Xq22.3 *env* Locus eliminieren würde, jedoch nicht angetroffen. Allerdings wurde ein neuer single nucleotide polymorphism (SNP) im HERV-W Xq22.3 *env* Locus beschrieben, welcher bei Kontrollen tendenziell häufiger als bei Patienten mit MS auftrat ($p = 0,07$). Die abschließende Relevanz dieses neu identifizierten SNP bei der MS müsste in Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl geklärt werden.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass die bisher als „MSRV“ bezeichneten Sequenzen von (z.T. rekombinierten) Transkripten von HERV-W Loci im humanen Genom abstammen. Diese Befunde haben wichtige Konsequenzen für die mögliche pathogenetische Rolle von MSRV bei der MS. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die als „MSRV“ bezeichneten Sequenzen auf ein replikationskompetentes, exogenes Retrovirus zurückgehen. Jedoch könnten von einem Provirus auf Chromosom Xq22.3 stammende Transkripte ein Env Protein kodieren, welches mit der surface Region von MSRV Env (für das vormals bereits proinflammatorische Eigenschaften gezeigt wurden) weitgehend übereinstimmt. Bemerkenswerterweise sind darüberhinaus die in vorangegangenen Arbeiten zur Herstellung von Antikörpern gegen MSRV Env verwendeten Sequenzen mit HERV-W Env Xq22.3 identisch. Nachdem diese Antikörper eine spezifische Immunreaktivität in MS-Läsionen zeigten, könnte dem HERV-W Xq22.3 Env Protein möglicherweise eine pathogenetische Relevanz bei der MS zukommen.

1.2 Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system. So far, the aetiology of MS is unclear, but both genetic and environmental factors seem to be involved. Concerning the latter, also retroviruses have been implicated in MS. Retrovirus-like particles containing a reverse transcriptase activity were described for the first time in 1989 in a leptomeningeal cell line derived from a patient with MS. After the amplification of particle-associated retroviral sequences from cell culture supernatants and plasma of patients with MS, these sequences were called MSR/V (MS associated retrovirus). Subsequently, MSR/V sequences turned out to be closely related to a new family of human endogenous retroviruses, HERV-W. HERVs are retroviral sequences which are stably integrated in human DNA and account for about 8 % of the human genome. They trace back to infections of the germline by exogenous retroviruses throughout evolution.

Different studies strongly indicate a possible pathogenetic role of the MSR/V Envelope (Env) protein as well as an Env protein encoded by a HERV-W copy on chromosome 7q21.2 (Syncytin-1) with MS. Nevertheless, the exact relationship between MSR/V and HERV-W has been unclear so far. Is MSR/V an exogenous retrovirus closely related to an endogenous retrovirus family? Could MSR/V be derived from endogenous HERV-W sequences? Is MSR/V an independent replication-competent retrovirus at all?

In case MSR/V would be an exogenous retrovirus associated with MS, MSR/V-*env* RNA transcripts should be specifically detectable in patients with MS. However, 13 of over 100 HERV-W loci in the human genome, contain full-length *env* genes which may possibly produce RNA transcripts as well thus complicating the detection of MSR/V-*env*. For these reasons we here examined which HERV-W-*env* loci are transcriptionally active in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with MS and healthy controls. Furthermore, we investigated whether MSR/V-*env* RNA transcripts are specifically detectable in patients with MS.

MSR/V / HERV-W-*env* mRNA transcripts from 4 patients with MS and 4 healthy controls were amplified, cloned and sequenced by RT-PCR with degenerated primers. The obtained sequences (n=332) were assigned to individual HERV-W-*env* loci in the human genome using characteristic sequence differences between HERV-W proviruses. Thus, 7 transcriptionally active HERV-W-*env* loci, including the Syncytin-1 locus on chromosome 7q21.2, could be identified in human PBMC's. Except for the Syncytin-1 locus, all remaining 6 transcrip-

tionally active HERV-W-*env* loci have the structure of processed pseudogenes, lacking a viral promoter. Concerning the transcriptional activity of individual proviruses no substantial differences between patients and controls were observed. However, a detailed analysis of the clones by multiple alignments revealed a surprisingly large fraction (approximately 30 %) of chimeric sequences, most likely resulting from *ex-vivo* recombinations between different HERV-W-*env* loci.

Based on these results, we re-analysed previously published MSRV sequences. It could be shown that all so-called MSRV sequences are either derived from individual (transcriptionally active) HERV-W loci or from recombinations between HERV-W loci.

Interestingly, a HERV-W-*env* locus on Chr. Xq22.3, which contributes significantly to several MSRV-*env* sequences, contains an open reading frame (ORF) putatively encoding a 475 amino acid Env protein. By orientation – specific reverse transcription it could be shown that transcripts from this HERV-W locus have the correct orientation for protein synthesis. In contrast to the full – length HERV-W Env Protein Syncytin-1, the HERV-W Xq22.3 Env protein is N-terminally truncated by a stop codon. Exactly this stop codon is mutated in one of the previously described MSRV-*env* clones which thus can give rise to a full – length Env protein. Examination of genomic DNA from 10 patients with MS and 10 healthy controls did not reveal an identical stop codon eliminating mutation in the HERV-W Xq22.3 *env* locus. Nevertheless, a new single nucleotide polymorphism (SNP) in the HERV-W Xq22.3 locus, which seemed to be more frequent in controls than in patients with MS ($p = 0,07$), was identified. The relevance of this new identified SNP for MS needs to be clarified in studies with higher case numbers.

In summary, our results indicate that the sequences previously called “MSRV” originate from (partly recombined) transcripts of HERV-W loci in the human genome. This finding has important consequences for the possible pathogenetic role of MSRV in MS. It is very unlikely that the sequences called “MSRV” originate from a replication – competent, exogenous retrovirus. However, transcripts of a provirus on Chr. Xq22.3 could possibly encode an Env protein which is identical to the surface domain of MSRV Env, for which proinflammatory effects have already been demonstrated. Remarkably, it turned out that the sequences, which were used for the production of antibodies against MSRV Env, are identical to HERV-W Xq22.3 Env. Considering the fact that these antibodies have revealed a specific immunoreactivity in MS lesions, the HERV-W Xq22.3 Env protein could be of potential relevance in the pathogenesis of MS.

2 Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine, erstmals 1868 von dem französischen Neurologen Jean-Martin Charcot beschriebene (Charcot, 1868) chronisch inflammatorische Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei welcher es zu einer Zerstörung der die Axone umgebenden Myelinscheiden kommt. Die vielfach (= multipel) auftretenden und sich später in „sklerosierte“ Glianarben umwandelnden Entmarkungsherde liegen in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark und können so vielfältige neurologische Symptome verursachen. Die Erkrankung tritt meist zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr auf (Koch-Henriksen, 1999) und Frauen sind in etwa doppelt so häufig wie Männer betroffen (Orton et al., 2006). Typischerweise kommt es bei der Multiplen Sklerose zum episodischen Auftreten von Symptomen in so genannten Schüben. Es werden drei Verlaufsformen der Erkrankung unterschieden (Lublin & Reingold, 1996). Am häufigsten ist der schubförmig remittierende Verlauf (=relapsing remitting MS) bei dem zeitlich voneinander abgegrenzt Symptome auftreten und sich vollständig oder teilweise zurückbilden. Dieser Krankheitsverlauf kann in die sekundär progrediente Verlaufsform (= secondary progressive MS) übergehen, die durch eine konstante Zunahme der Symptomatik geprägt ist. Selten kommt es von Beginn an zu einer kontinuierlichen Progression der neurologischen Defizite, was als primär progrediente MS (= primary progressive MS) bezeichnet wird. Die Inzidenz der MS steigt mit zunehmenden Abstand sowohl nördlich als auch südlichen des Äquators an, während die Krankheit in den (Sub)Tropen und in Asien sehr selten ist (Kurtzke, 1995).

Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher ungeklärt. Unter anderem wird von einer Beteiligung genetischer Faktoren ausgegangen. Bei Verwandten von Patienten mit MS steigt das relative Risiko einer Erkrankungsmanifestation von ca. dem dreifachen der Allgemeinbevölkerung bei einer Verwandtschaft 3. Grades (Robertson et al., 1996) bis auf etwa das 103 – fache relative Risiko bei eineiigen Zwillingen an (Mumford et al., 1994). Verschiedene Hinweise sprechen jedoch auch für eine Beteiligung von Umweltfaktoren. Personen die in ihrer Kindheit aus Gebieten mit hoher MS-Inzidenz in Regionen mit niedriger Inzidenz auswandern, weisen das dortige, niedrigere Erkrankungsrisiko auf (Gale & Martyn, 1995), was sich nicht alleine durch genetische Faktoren erklären lässt. Erstaunlicherweise kommt es bei einer Mig-

ration in umgekehrter Richtung von Regionen mit niedrigem MS-Risiko in Gebiete mit hoher MS-Inzidenz nicht zu einer solchen Angleichung des Erkrankungsrisikos (Elian et al., 1993), wobei die Kinder der Migranten jedoch die örtliche, erhöhte MS-Inzidenz aufweisen. (Elian et al., 1990) Ein innerhalb einer Generation ansteigendes Risiko lässt sich ebenfalls nicht alleine durch eine genetische Prädisposition für die Erkrankung erklären.

Auch für die Beteiligung eines infektiösen Erregers an der Krankheitsentstehung gibt es Hinweise. So war z.B. die MS auf den Faroer Inseln bis zur Besetzung durch die britische Armee 1940 praktisch unbekannt, während es zwischen 1943 und 1960 zu 25 Neuerkrankungen, hauptsächlich Regionen in welchen die Truppen stationiert waren, kam (Kurtzke et al., 2001) Eine Betrachtung des zeitlichen Ablaufs führte zu der Hypothese, dass ein weit verbreitetes, infektiöses Agens existiert, welches meist eine persistente, asymptomatische Infektion hervorruft, die jedoch manchmal Jahre nach der eigentlichen Infektion neurologische Symptome (= MS) hervorrufen kann (Kurtzke, 1993). Ein Erreger, für den ein Zusammenhang mit der MS hochwahrscheinlich ist, stellt das Epstein-Barr-Virus (EBV) dar. In longitudinalen Studien zeigte sich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer MS nach einer stattgehabten infektiösen Mononukleose, d.h. einer klinisch manifesten EBV-Infektion im Jugend- oder Erwachsenenalter (Thacker et al., 2006 / Goldacre et al., 2004). Eine 2007 durchgeführte Metaanalyse von 13 Studien ergab, dass Personen, die in der Kindheit mit EBV infiziert wurden im Vergleich zu EBV-seronegativen Kontrollen ein etwa 10-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen. Personen, die an einer Mononukleose erkrankt waren, besaßen gegenüber den nicht-EBV-Infizierten ein 20-fach erhöhtes Risiko an MS zu erkranken (Ascherio & Munger, 2007). Für andere Erreger ergab sich bisher keine vergleichbar starke Assoziation mit der MS.

In letzter Zeit sind auch Retroviren mit der Multiplen Sklerose in Verbindung gebracht worden. Im Folgenden soll daher allgemein auf mögliche, durch Retroviren ausgelöste Pathomechanismen eingegangen und diesbezügliche Vorbefunde bei der Multiplen Sklerose dargestellt werden.

2.2 Retroviren

2.2.1 Retroviren und ihre Bedeutung als Krankheitserreger

Retroviren sind umhüllte Viren mit einem aus einer Einzelstrang-RNA bestehenden Genom. Sie sind durch das Vorhandensein einer reversen Transkriptase (RT) definiert, einem viralen Enzym welches ihre RNA nach der Infektion der Wirtszelle in DNA umschreibt, die sog. Reverse Transkription (Goff, 2000). Die Entdeckung dieses Enzyms widerlegte ein bis dahin geltendes Dogma, dass DNA zwar zu RNA, RNA jedoch nie in DNA transkribiert werden kann (Temin & Mizutani, 1970 / Temin & Baltimore 1972). Bereits 1964 wurde die Provi-rus-Theorie aufgestellt, welche besagt, dass es Viren gibt, welche eine intermediäre Virusform in das Genom des Wirtes integrieren (Temin, 1964). Es stellte sich heraus, dass das Genom von Retroviren ein Enzym (Integrase) kodiert, welches die Integration der, revers transkribierten, viralen DNA in das Erbgut des Wirtes ermöglicht. Nach der Integration nutzt das DNA-Provirus die zellulären Proteinsynthesemechanismen um virale Proteine herzustellen. Die so synthetisierten viralen Proteine organisieren sich entweder im Zytoplasma oder an der Plasmamembran zu neuen Viruspartikeln, welche anschließend beim sogenannten „Budding“ freigesetzt werden. Dabei stülpen die Viruspartikel beim Verlassen der Wirtszelle einen Teil der Zellmembran aus, so dass diese als äußere Virushülle dient. Der Vermehrungszyklus der Retroviren ist für deren Rolle als Krankheitserreger von Bedeutung, da die Reverse Transkription und die Integration zu Pathomechanismen wie der Mutagenese durch Insertion und der Aktivierung von Onkogenen führen kann (Nevins, 2001).

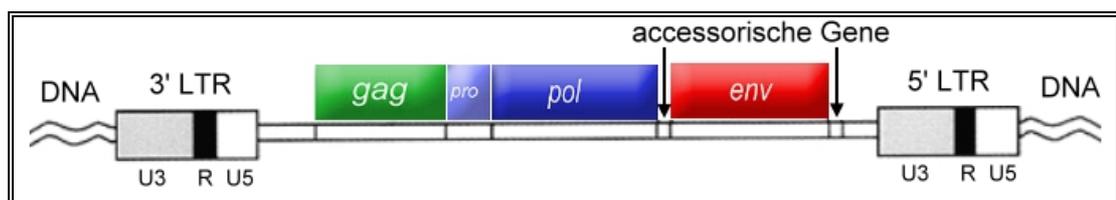


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines in die Wirts – DNA integrierten retroviralen Genoms. Auf beiden Seiten des Provirus befinden sich long terminal repeats (= LTR) bestehend aus U3, R und U5 Elementen welche für die Transkription wichtige Sequenzen wie z.B. den Promotor (U3 Region) enthalten. Außerdem enthält das Genom die für die viralen Proteine kodierenden *gag*, *pol* und *env* Regionen. *gag* (von „gruppenspezifische Antigene“) kodiert die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. *pol* kodiert die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase (inklusive RNase H) und Integrase. Beta - und Deltaetroviren besitzen ein eigenes Leseraster für die Protease = *pro*. *env* (von „envelope“) kodiert die Proteine der Virushülle. Weitere accessorische Gene können an den markierten Stellen liegen und sowohl *env* als auch U3 überlappen.

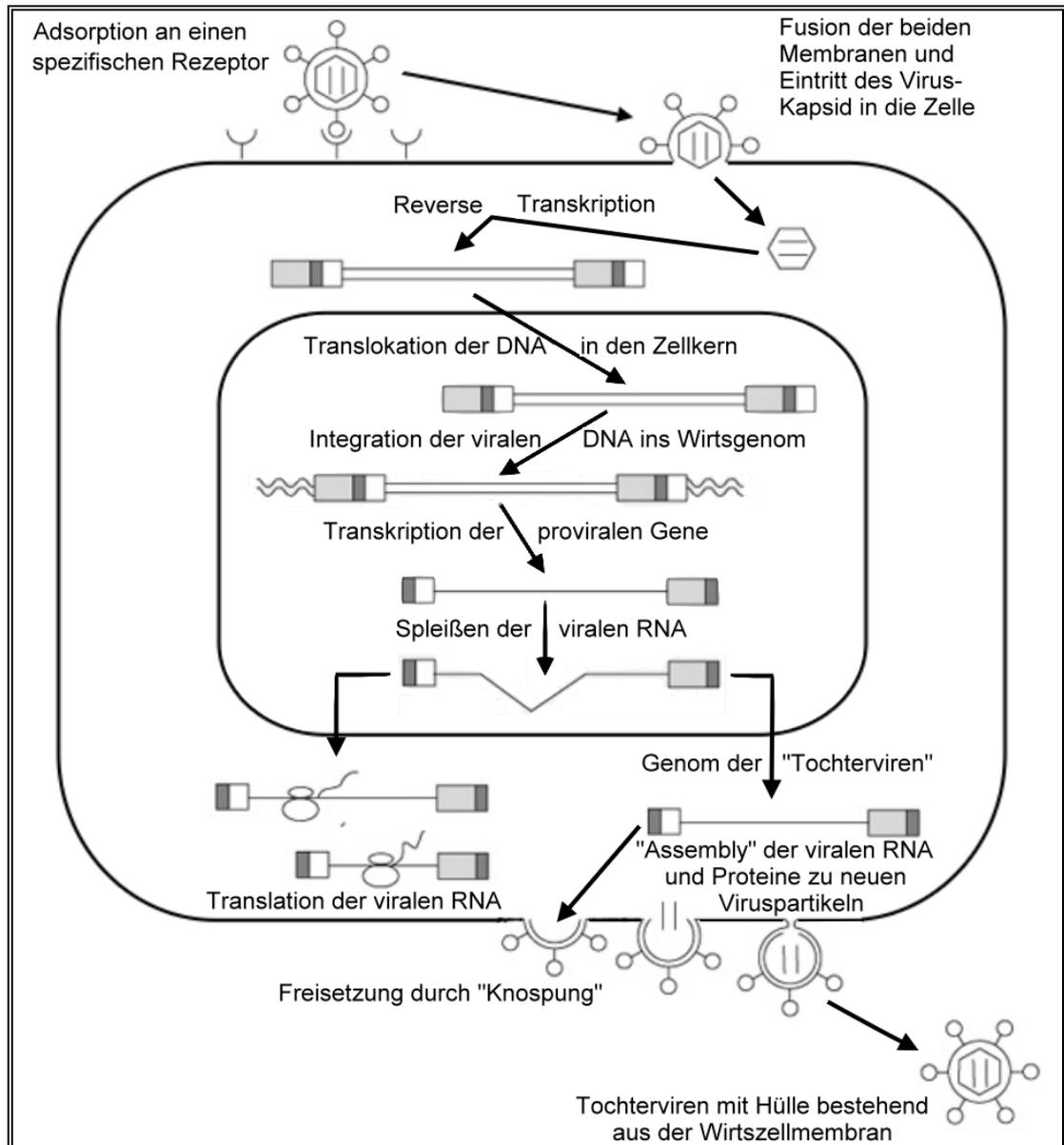


Abbildung 2: Schematischer Replikationszyklus exogener Retroviren. Die Bindung von Hüllproteinen an einen, für das Virus spezifischen Rezeptor ermöglichen die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran, wodurch das Virus-Kapsid in die Zelle gelangt. Nach der, für Retroviren typischen, Reversen Transkription ihres Genoms von RNA zu DNA wird diese mit Hilfe einer viralen Integrase als so genanntes Provirus ins Wirtsgenom integriert. Zur Vermehrung werden die proviralen Gene transkribiert, die entstehende RNA unter Umständen noch durch Spleißen verändert und anschließend die viralen Proteine synthetisiert. Virusproteine und virale RNA finden sich beim sog. „Assembly“ zu neuen Viruspartikeln zusammen, welche durch das Budding eine Hülle, bestehend aus der Zellmembran des Wirtes, erhalten und freigesetzt werden.

Retroviren stellen eine große Gruppe von Krankheitserregern dar, die sowohl bei Tieren als auch beim Menschen eine Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. Tumore, immunologische und neurologische Erkrankungen verursachen können (Goff, 2000). Bereits 1904 wurde ein

filtrierbares Agens mit der Equinen Infektiösen Anämie des Pferdes in Verbindung gebracht (Vallé & Carré 1904). 1908 gelang es den Dänen Vilhelm Ellermann und Oluf Bang nachzuweisen, dass auch die Hühner-Leukose, eine Lymphomerkrankung bei Geflügel, durch ein Virus übertragen wird (Ellermann & Bang, 1908). Beide Erreger stellten sich später als Retroviren heraus. Die Bedeutung von Retroviren als tierische Krankheitserreger führte zur Suche nach vergleichbaren Erregern als Ursache menschlicher Erkrankungen, wobei es bisher gelang, vier infektiöse humane Retroviren zu identifizieren. Als erstes wurde 1980 das humane T-Zell-Leukämie Virus Typ 1 (HTLV-1) entdeckt (Poiesz et al., 1980), welches mit zwei Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. Zum einen kann es die adulte T-Zell-Leukämie (ATL) hervorrufen und zum anderen bei einem kleinen Teil der infizierten Personen zu einer neurologischen Erkrankung, der Tropischen Spastischen Paraparese (auch als HTLV-1 assoziierte Myelopathie = HAM bezeichnet) führen (Gessain et al, 1985 / Osame et al., 1986). Kurz nach der Entdeckung von HTLV-1 wurde ein als HTLV-2 bezeichnetes, verwandtes Virus bei Patienten mit Haarzellleukämie nachgewiesen (Kalyanaraman et al., 1982) wobei ein ätiologischer Zusammenhang mit dieser Erkrankung weiterhin spekulativ bleibt (Roucoux & Murphy 2004). 1983 und 1986 wurden von der Arbeitsgruppe um Luc Montagnier die Humanen-Immundefizienz-Viren HIV-1 bzw. HIV-2, welche beide die erworbene Immunschwäche acquired immune deficiency syndrome (AIDS) verursachen, entdeckt. (Barré-Sinoussi et al., 1983 bzw. Clavel et al., 1986)

2.2.2 Endogene Retroviren

Kommt es zu einer Infektion von Zellen der Keimbahn durch ein Retrovirus, so kann das retrovirale Genom bei der Fortpflanzung zu einem festen Bestandteil des Wirtsgenoms werden. Dies hat zur Folge, dass das Virus von nun an vertikal von einer zur nächsten Generation weitergegeben wird. Retroviren, welche so die Keimbahn besiedelt haben, werden als endogene Retroviren (ERV) bezeichnet, um sie von horizontal übertragenen, exogenen Retroviren zu unterscheiden (Vogt in Coffin, Hughes & Varmus 1997). Die ersten ERV wurden in den späten 60er und frühen 70er Jahren entdeckt. Drei verschiedene ERV's wurden nahezu zeitgleich identifiziert: Das „avian leukosis virus“, welches die bereits als Viruserkrankung erkannte Hühner-Leukose hervorruft, das Murine Leukämievirus (MLV) und das Maus-Mammatumovirus (murine mammary tumor virus = MMTV) (Weiss, 2006). Diese ERV's haben gemeinsam, dass sie sowohl in einer infektiösen, exogenen Form als auch in einer erblichen, endogenen Variante existieren.

Ein Beispiel für eine pathogenetisch bedeutsame Interaktion von endogenen mit exogenen Retroviren sind die Wildmäuse vom Lake Casitas in Californien. Von ihnen existieren zwei Populationen, eine davon entwickelt eine, durch eine exogene pathogene MLV Variante hervorgerufene Myelitis. Bereits kurz nach der Geburt findet die Infektion mit dem exogenen Virus statt, gefolgt von einer monatelang anhaltenden Virämie. Die zweite Mäusepopulation ist gegen die Erkrankung immun. Die Immunität ist durch ein genetisches Merkmal (FV4) determiniert. Hierbei handelt es sich um ein Gen welches für eine defekte, endogene MLV Sequenz kodiert. Dieses ERV führt zur Synthese eines glykosylierten Hüllproteins (envelope) welches an die selben Oberflächenrezeptoren bindet, die auch von der pathogenen, infektiösen MLV Variante genutzt werden um in die Zellen einzudringen und schützt so vor einer Infektion mit dem exogenen Virus (Gardner et al., 1991). In diesem Fall ist die Expression eines endogenen retroviralen Proteins mit einer reduzierten Vulnerabilität gegenüber einem exogenen Retrovirus verbunden, wobei die Ätiologie der Erkrankung sowohl durch erbliche als auch durch Umweltfaktoren bedingt ist.

Bei allen untersuchten Wirbeltierarten konnten bisher ERV's im Erbgut nachgewiesen werden. Es wird geschätzt, dass humane ERV's (HERV's) und verwandte Sequenzen wie z.B. solitäre LTR und retrotransposon-ähnliche Elemente (d.h. Proviren ohne *env* Gen) etwa 8% der menschlichen DNA ausmachen (IHGSC, 2001). Die humanen ERV's wurden anhand der Ähnlichkeiten ihrer Sequenzen zu Gamma- und Betaretroviren bzw. Spumaviren in drei Klassen, Klasse I, II und III eingeteilt (Abbildung 3). Jede Klasse wiederum enthält mehrere HERV-Familien wobei man davon ausgeht, dass jede einzelne ursprünglich durch ein individuelles Integrationsereignis in die Keimbahn entstanden ist (Gifford & Tristem, 2003). Nach dieser initialen Infektion von Keimzellen vervielfältigte sich das Virus entweder durch Reinfektion oder durch intrazelluläre Retrotransposition, was zu neuen Integrationen in die Keimbahn und zur Ausbreitung im humanen Genom führte (de Parseval & Heidmann, 2005). Etwa 30 000 HERV Elemente wurden so in etwa 150 Familien eingeteilt (de Parseval & Heidmann, 2005 / Pačes et al., 2004). Der Zeitraum der seit der Integration in das Genom vergangen ist, lässt sich mittels der Sequenzunterschiede zwischen den 5' und 3' LTR's eines Provirus abschätzen, da diese zum Zeitpunkt der Integration identisch gewesen sind (de Parseval & Heidmann, 2005). Die meisten Infektionen von evolutionären Vorfahren des Menschen mit HERV's scheinen vor etwa 20 bis 40 Millionen Jahren stattgefunden zu haben. Zwei HERV Familien wurden außer bei Mensch und Primat auch bei anderen Wirbeltieren nachgewiesen. Dies ist zum einen HERV-L welches sich auch bei Mäusen, Hasen, Hunden und Kühen findet, während HERV-I sogar bei Vögeln, Reptilien und Fischen nach-

gewiesen wurde (Martin et al., 1997 / Benit et al., 1999). Es existiert keine Standardnomenklatur nach welcher HERV-Familien benannt werden. Viele wurden jedoch nach der spezifischen tRNA der Primerbindungsstelle (= PBS) benannt, welche benutzt würde um die Reverse Transkription zu beginnen, wenn das Virus noch replikationskompetent wäre. Demnach besitzt HERV-K zum Beispiel eine Primerbindungsstelle welche zu einer Lysin tRNA (= K im Standardaminosäurecode) passt (Villesen et al., 2004).

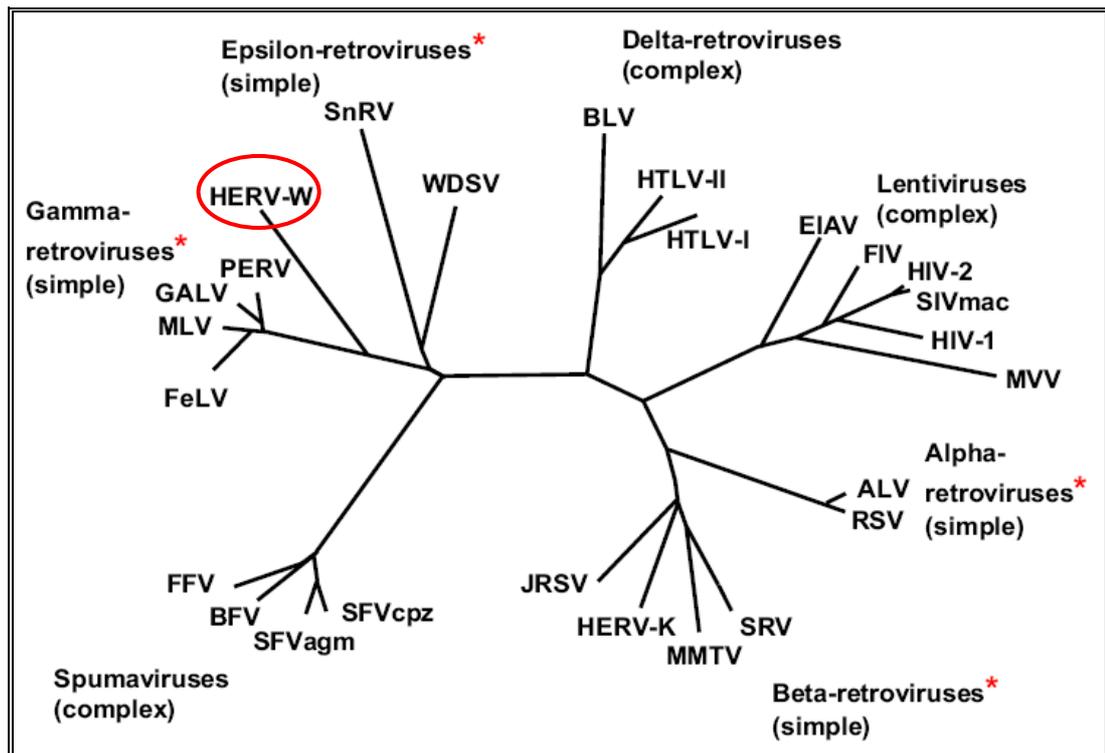


Abbildung 3: Phylogenetische Einteilung der Retroviren. Familien welche endogene Retroviren enthalten sind mit * gekennzeichnet (ALV = avian leucosis virus, BFV = bovine foamy virus, BLV = bovine leukemia virus, EIAV = equine infectious anemia virus, FeLV = feline leukemia virus, FFV = feline foamy virus, FIV = feline immunodeficiency virus, GALV =ibbon ape leukemia virus, HERV = human endogenous retrovirus, HTLV = human T-cell leukemia virus, JRSV = Jaagsiekte sheep retrovirus MMTV = mouse mammary tumor virus, MLV murine leukemia virus, MVV = Maedi-Visna virus, PERV = porcine endogenous retrovirus, RSV = Rous sarcoma virus, SFV = simian foamy virus, SIVmac = simian immunodeficiency virus, SnRV = simian endogenous retrovirus, SRV = simian retrovirus, WDSV = walleye dermal sarcoma virus).

2.2.3 Humane endogene Retroviren als Pathogene

Der überwiegende Teil dieser endogenen Proviren sind auf Grund der Ansammlung von zahlreichen Mutationen, Deletionen und Trunkierungen defekt. Dennoch lassen sich Transkripte von HERV RNA in vielen gesunden menschlichen Geweben und in Zellkulturen nachweisen (Pichon et al., 2006 / Seifarth et al., 2005). In einigen Fällen kann es sogar zur

Synthese viraler Proteine oder gar Partikel kommen (siehe auch Kap. 2.3.4). In Anlehnung an ERV's als Tierpathogene wurde die Hypothese aufgestellt, dass HERV's auch bei humanen Tumor- und Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen könnten. Bis heute ist allerdings weder für ein HERV eine ursächliche Rolle bei einer Erkrankung bewiesen, noch ein replikationskompetentes HERV beschrieben worden. Im Folgenden soll kurz auf mögliche, durch HERV's hervorgerufene Pathomechanismen eingegangen werden.

2.2.3.1 Insertionsmutagenese

Bei Tieren ist die Fähigkeit endogener Retroviren zur Bildung neuer proviraler Insertionen in der Wirts – DNA eine der Hauptursachen für von ihnen hervorgerufene Erkrankungen. Durch die Neuintegration eines Provirus könnten (Onko)Gene aktiviert oder verstärkt exprimiert, aber auch in ihrer physiologischen Funktion beeinträchtigt werden. Anders als für humane LINE Elemente wurde eine Ausbildung neuer Insertionen durch HERV's bisher nicht direkt nachgewiesen. 2001 wurden erstmals zwei Fälle von HERV-K Integrationspolymorphismen beschrieben. Die beiden Proviren HERV-K113 und HERV-K115 sind nur bei 30 % bzw. 15 % der Bevölkerung im Genom vorhanden und ersteres besitzt offene Leseraster für alle viralen Proteine (Turner et al., 2001). Das Vorhandensein dieser Integrationspolymorphismen bedeutet, dass die beiden genannten HERV-K Proviren noch bis vor relativ kurzer evolutionärer Vergangenheit in der Lage gewesen sein müssen Menschen zu infizieren. Stellt man die Hypothese auf, dass bis heute integrationsaktive HERV's existieren, so müssten sich bei vereinzelt Personen individuelle, neue Insertionsstellen bestimmter Proviren im Genom nachweisen lassen.

2.2.3.2 Gen-Verlust durch chromosomale Rekombination

Zwischen benachbarten und sich in ihrer Sequenz sehr ähnlichen repetitiven Elementen können unerwünschte Rekombinationen auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass die Beteiligung von HERV's bei derartigen Rekombinationen keine Seltenheit ist und sich z.B. auch für fünf HERV-K Loci nachweisen ließ (Hughes & Coffin, 2005). Das mit einer Azoospermie verbundene „Sertoli – only syndrom“, die häufigste Ursache einer Infertilität beim Mann, ist ein Beispiel für eine durch Rekombination hervorgerufene Erkrankung. Dabei geht der 792 kb große Azoospermiefaktor AZFa durch eine Rekombination zwischen HERV15yq1 und HERV15yq2, beide auf Chromosom Yq11 gelegen, verloren (Sun et al., 2000).

2.2.3.3 Rekombination des viralen Genoms und Reaktivierung von HERV's

Stop-Codone und Leserasterverschiebungen, welche zu einer Inaktivierung der Mehrzahl der HERV's führen, können auf Grund von „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs = Punktmutationen) interindividuell variieren. Über das Ausmaß dieser Unterschiede in HERV Sequenzen beim Menschen ist wenig bekannt aber vermutlich sind solche „Varianten“ nicht ungewöhnlich. Viele Retrotransposon-Elemente sind durch Methylierung inaktiviert, wobei das Ausmaß der Methylierung variabel ist (Schulz et al., 2006). So ist es vorstellbar, dass nach einer vorübergehenden Demethylierung ein vorher inaktives Provirus funktionelle Enzyme (RT und IN) herstellt, während ein anderes Provirus ein intaktes Hüllprotein synthetisiert. Es ist denkbar, dass ein HERV-Partikel RNA von verschiedenen, mehr oder minder intakten, Mitgliedern einer HERV-Familien enthält. Während der Reversen Transkription könnte es zu Rekombinationen der RNA kommen und das rekombinierte virale Genom bei der Infektion weiterer Zellen neu reintegriert werden. Ein solcher Prozess könnte sich durch Selektion selbst optimieren und so zu Partikeln führen, die ein mehr oder minder infektiöses, exogenes Retrovirus darstellen. Bei der Entstehung der durch MLV hervorgerufenen Leukämien bei AKR – Mäusen wird dieser Mechanismus regelmäßig beobachtet und als „patch-repair“ bezeichnet (Quint et al., 1981). Faktoren wie z.B. das Vorhandensein bestimmter SNPs und damit verbunden mehr oder weniger intakter HERV-Proviren im Genom könnten diesen Prozess beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass einige HERV-K Proviren offenbar dazu in der Lage sind funktionierende Proteine zu exprimieren. In humanen Teratokarzinomzellen wurden Retroviruspartikel beobachtet, für welche gezeigt werden konnte, dass sie durch HERV-K Sequenzen kodiert sind (Löwer et al., 1993).

2.2.3.4 Molecular Mimicry

Sowohl HTLV-1 als auch HIV-1 können entzündliche Symptome auslösen, was zu der Theorie geführt hat, dass andere Retroviren eine Rolle bei der Entstehung inflammatorischer Erkrankungen spielen könnten. Einige Patienten mit HIV entwickeln eine Entzündung der Speicheldrüsen, welche dem Sjögren Syndrom ähnelt, während andere an Vaskulitiden erkranken (Garry et al, 1995). Auch HTLV-1 kann eine ganze Reihe von inflammatorischen Reaktionen hervorrufen von denen die Tropische Spastische Paraparese klinisch am offensichtlichsten ist. Eine Vielzahl von Hypothesen wurden aufgestellt, wie Retroviren solche Autoimmunreaktionen auslösen könnten, darunter allgemeine Modelle wie eine Lymphozytenaktivierung oder die verstärkte Expression von MHC Rezeptoren und proinflammatorischen Zytokinen. Die direkten Effekte retroviraler Proteine wie z.B. durch „molecular Mi-

micry“ oder ihre Wirkung als Superantigene (SAG) werden allerdings allgemein favorisiert (Garry et al., 1995 / Fujinami et al., 2006). Als „molecular mimicry“ wird eine Immunreaktion gegen einen Infektionserreger bezeichnet, welche aufgrund gemeinsamer immunologischer Epitope von Mikrobe und Wirt, mit einem Wirtsantigen kreuzreagiert. Trotz einer Immuntoleranz durch die Entfernung autoreaktiver T-Lymphozyten während deren Reifung im Thymus überdauern auch in gesunden Individuen einige autoreaktive T-Zellen diese Selektion (Kamradt & Mitchison, 2001). Vergleichbar damit existieren auch autoreaktive B-Lymphozyten. Kommt es bei prädisponierten Personen nun zu einer Infektion mit einem Pathogen, welches ein Protein mit gemeinsamen Epitop kodiert, können diese autoreaktiven T-Zellen aktiviert werden (Fujinami et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Tropischer Spastischer Paraparese Antikörper gegen ein C-terminales Epitop eines HTLV-1 Tax Proteins besitzen, welche mit einem für Neurone spezifischen ribonukleären Antigen, nämlich hnRNP-A1 kreuzreagieren (Levin et al., 2002). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu exogenen Retroviren sind auch HERV Proteine als mögliche Autoantigene in Betracht gezogen worden (Colmegna et al., 2006). Auch wenn gezeigt wurde, dass bei bestimmten Erkrankungen T-Zellen bzw. Antikörper vorkommen die HERV Proteine erkennen können (Hervé et al., 2002 / Garrison et al., 2007), ist die pathogenetische Relevanz dieser Befunde aktuell weitgehend unklar.

2.2.3.5 Wirkung viraler Proteine als Superantigene

Als Superantigene wird eine, von manchen Viren und Bakterien kodierte Gruppe von Proteinen bezeichnet, welche T-Lymphozyten durch eine Wechselwirkung mit der V β Kette des T-Zellrezeptors direkt aktivieren, ohne dabei auf ein bestimmtes Epitop beschränkt zu sein (White et al., 1989). Dies führt zu einer starken polyklonalen T-Zell Aktivierung, sowie zu einer massiven Zytokinausschüttung. Die Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit eines spezifischen Antigens kann zu einer verminderten Reaktion auf andere Antigene führen. Als Konsequenz der SAG Aktivität kann es zu einem peripheren Mangel an T-Zellen einer bestimmten V β Rezeptorklasse, aber auch einer Proliferation der gleichen T-Zell Unterklasse kommen. Durch ihre Fähigkeit das Immunsystem unspezifisch zu aktivieren kommen Superantigene als mögliche Mediatoren von Autoimmunerkrankungen in Frage. Zahlreiche Viren sind mit Superantigenen in Verbindung gebracht worden, wobei das am besten verstandene Beispiel ein von MMTV kodierte SAG ist, welches eine zentrale Funktion bei der Virusvermehrung einnimmt (Acha-Orbea & MacDonald, 1995). Auch HIV, dem Tollwutvirus, EBV sowie dem humanen Cytomegalovirus wurde eine SAG-Aktivität zugeschrieben, je-

doch konnten in diesen Fällen noch keine entsprechenden viralen Gene oder aber als SAG wirkendes Protein identifiziert werden (Woodland, 2002). Teilweise wurde das Vorhandensein eines SAG auch postuliert, um die unangemessene T-Zellaktivierung bei Autoimmunerkrankungen zu erklären, bei denen es zu einer Depletion einer bestimmten V β Subklasse kommt (Conrad et al, 1994). Weiterhin gelang es zu zeigen, dass sich mit Interferon α ein, durch HERV-K18 kodiertes, Env Protein induzieren lässt, welches superantigene Eigenschaften besitzt. (Stauffer et al., 2001) Wenig später wurde eine Transaktivierung dieses HERV-Superantigens auch durch EBV belegt, wobei dazu ein Protein des latenten Zyklus von EBV, nämlich LMP-A2, ausreichend ist (Sutkowski et al., 2001 bzw. 2004). Dieser Zusammenhang stellt ein Modell dafür dar, wie unterschiedliche Viren bei einer Infektion indirekt eine superantigene Aktivität entfalten könnten.

2.3 MSRV und die endogene Retrovirenfamilie HERV-W

2.3.1 Die Entdeckung von MSRV - Retrovirale Partikel in Zellkulturen von Patienten mit MS

In den vergangenen Jahrzehnten ist viel über die Beteiligung eines infektiösen Agens an der Entstehung von MS spekuliert worden und eine Reihe von Erregern wie z.B. Herpesviren (Simmons, 2001), Coronaviren (Murray et al., 1992), Paramyxoviren, Tollwut-, Masernviren (Pille et al., 1977) und auch Retroviren wurden zuletzt mit der Erkrankung in Verbindung gebracht. Bei der Untersuchung von Zellkulturen aus Liquorproben von Patienten mit MS etablierten Perron et al. 1989 aus dem Liquor einer 57 – jährigen Patientin eine leptomeningeale Zelllinie (LM7) in deren Überstand eine Reverse-Transkriptase-Aktivität festgestellt wurde (Perron et al., 1989). Diese Reverse-Transkriptase-Aktivität ließ sich durch Behandlung der Zellkultur mit Mitogenen wie z.B. Phorbol-Myristat-Säure steigern. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der obigen Zellkultur wurden vereinzelt retrovirus-ähnliche Partikel mit einer Größe von 100 – 140 nm gesehen (vgl. Abbildung 4). Zwei Jahre darauf wurde von einer Reverse-Transkriptase-Aktivität in 12 von 21 Monozytenkulturen, welche von Patienten mit MS gewonnen worden waren, berichtet, während die Kulturen von 14 Kontrollen negativ ausfielen (Perron et al., 1991). Auch hier konnten in elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zellkulturüberstandes von Kulturen mit positiver RT-Aktivität retrovirus-artige Partikel beobachtet werden. Das Serum zweier Patienten mit deutlicher RT-

Aktivität sowie zweier Kontrollen wurde in einem Westernblot mit aufgereinigten LM7 Virionen getestet, wobei sich für die beiden Patienten spezifische Banden bei 90, 65, 60, 50, 45 und 15 kD ergaben. Eine Reihe von Versuchen, immortalisierte Zellen mit dem LM7 Virus zu infizieren scheiterten. Es konnte lediglich in einer leptominengeale Zelllinie eines anderen Patienten (LM11) durch Co-Kultur mit röntgenbestrahlten LM7 Zellen eine Virusproduktion erreicht werden (Perron et al., 1992). Auch für Zellkulturüberstand dieser neuen Zelllinie mit RT-Aktivität (LM711) wurden in einem Westernblot mit Serum von zwei MS-Patienten wieder die gleichen Banden wie zuvor beobachtet, jedoch nicht bei zwei gesunden Kontrollen. In einem Radioimmunpräzipitations-Assay (RIPA) reagierten 12 von 20 MS-Seren und nur zwei von 21 Kontrollseren positiv mit einer LM711 Antigenpräparation (Perron et al., 1992). Es gelang zu zeigen, dass die Partikelproduktion der LM7 Zellen durch eine Superinfektion mit HSV-1 potent stimuliert werden kann (Perron et al., 1993). Dabei war eine

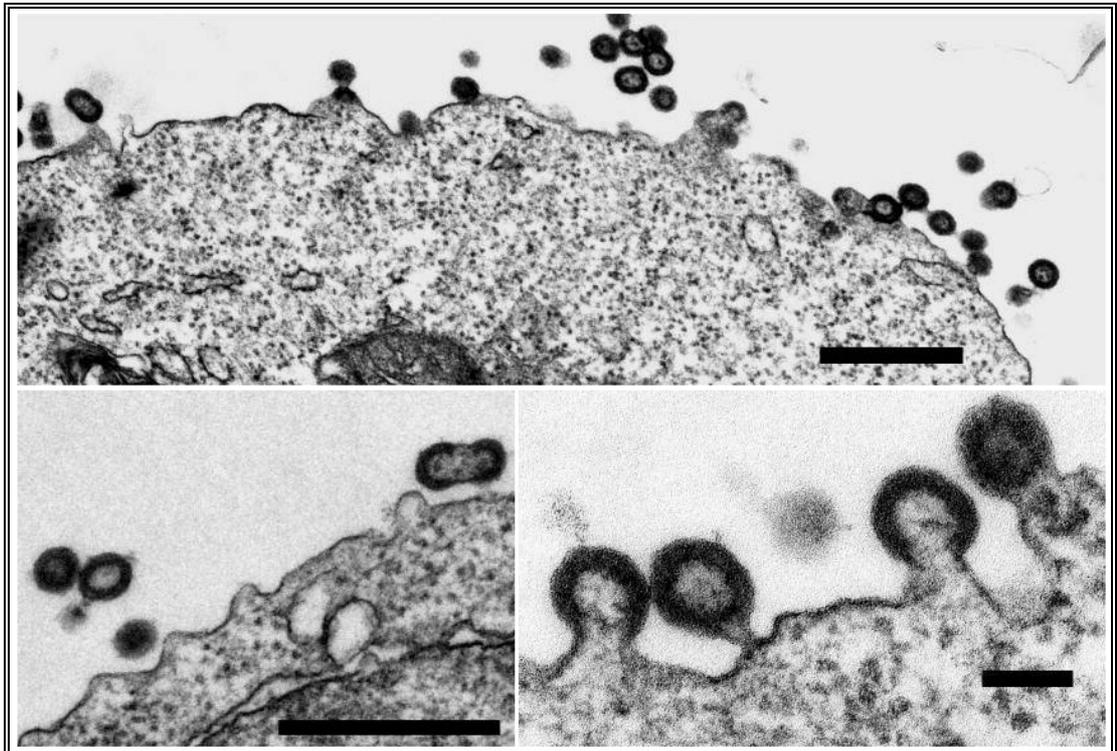


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von retrovirus-artigen HERV-K Partikeln. Oben: zahlreiche HERV-K Partikel an der Zellmembran einer Zelle welche mit einem HERV-K Expressionsplasmid transfiziert wurde, Balken = 500 nm. Unten rechts: HERV-K Partikel beim Durchtritt durch die Zellmembran (Budding), Balken = 100 nm. Unten links: retrovirus-artige HERV-K Partikel nach dem Budding, Balken = 500 nm. (Lee & Bieniasz, 2007) Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der LM7 Zellkulturen wurden von Perron et al. 1989 entsprechende, später als MSRV bezeichnete, retrovirus-artige Partikel gesehen (Perron et al., 1989)

Transfektion der LM7 Zellen mit einem, Herpes Simplex immediate early protein ICP0 und ICP 4 exprimierenden Plasmid zur Stimulierung der Virusproduktion ausreichend. Eine zweite Arbeitsgruppe berichtete 1991 ebenfalls unabhängig von der Entdeckung retrovirusartiger Partikel in einer T-Zelllinie von Patienten mit MS (Haahr et al., 1991). Bis zu diesem Zeitpunkt war noch kein, mit den beschriebenen LM7 Viruspartikeln assoziiertes retrovirales Genom identifiziert worden.

2.3.2 Klonierung eines mutmaßlichen, partikelassoziierten retroviralen Genoms und Beschreibung von MSRV

Mit der Zielsetzung, das virale Genom zu klonieren, welches die LM7 Partikel kodiert, wurde zunächst der Überstand von B-Zellkulturen von Patienten mit MS, welche eine RT-Aktivität aufwiesen und retrovirus-artige Partikel produzierten, im Saccharose-Gradienten aufgereinigt. Daraufhin wurde die Dichte-Fraktion isoliert, welche die mutmaßlichen Viruspartikel enthielt. Anschließend wurden davon mehrere cDNA-Klone ohne vorherigen PCR Schritt sequenziert und außerdem eine RT-PCR unter Verwendung von degenerierten Primern, die die *pol* Region zahlreicher bekannter Retroviren erkennen, durchgeführt. Diese Technik wurde speziell für diesen Zweck zuvor von Tuke et al. entwickelt und beschrieben (Tuke et al., 1997). Unter Verwendung der dabei erhaltenen Sequenzen wurden weitere Primer entworfen und in mehreren PCR-Schritten eine komplette retrovirale *pol* – Sequenz (AF009668) identifiziert (Perron et al., 1997) (näheres siehe Kap. 6.2.3). Diese neue, gamma-retrovirale Sequenz wurde in Verbindung mit den, auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachteten, retrovirusartigen Partikeln als Multiple-Sklerose-assoziierten Retrovirus (MSRV) bezeichnet.

In einer Folgestudie wurden weitere, ein komplettes virales Genom umfassende, mutmaßliche MSRV-Sequenzen aus dem Zellkulturüberstand von mit EBV immortalisierten B-Zellen von Patienten mit MS sowie dem Plasma von Patienten mit, teilweise auch nur wahrscheinlicher, MS und einem an Rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten amplifiziert (Komurian-Pradel et al., 1999) (siehe auch Kap. 6.2.1).

2.3.3 Die endogene – Retrovirusfamilie HERV-W

Bereits 1997 während der Suche nach einer mit den LM7 Partikeln assoziierten *pol* – Sequenz zeigte sich in einem Southern Blot, mit einer für die neue MSRV-*pol* Sequenz spezifischen Sonde, eine Hybridisierung mit zahlreichen Loci einer bisher unbekanntten Familie

endogener Retroviren. Bei einer anlässlich dieses Befundes durchgeführten PCR-Studie konnten unterschiedliche Sequenzen aus genomischer DNA amplifiziert werden, welche mit der mutmaßlichen MSR_V-*pol* Sequenz eng verwandt waren (Perron et al., 1997). In einer anschließend durchgeführten Studie konnte, ausgehend von den MSR_V Sequenzen eine neue HERV Familie im humanen Genom (HERV-W) charakterisiert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Primer-Bindungsstelle zu der bei Vogel – Retroviren beschriebenen Primer-Bindungsstelle, welche zu einer Tryptophan tRNA (= W im Standard-Aminosäurecode) passt, wurde diese Familie als HERV-W bezeichnet. Außerdem wurde gezeigt, dass sich im humanen Genom kein replikationskompetentes, ein komplettes provirales Genom umfassendes, HERV-W Provirus befindet (Blond et al., 1999). Weiterhin wurde ein auf Chromosom 7q21.2 liegendes HERV-W Provirus mit einem offenen Leserahmen für ein 538 AS großes volllängiges Envelope Protein identifiziert (siehe Kap. 2.3.4) von welchem in Plazentagewebe verschiedene mRNA Transkripte nachgewiesen wurden. Bei der genaueren Untersuchung der HERV-W Gruppe fand man 70 *gag*, 100 *pro* und 30 *env* Loci mit jeweils einem größeren offenen Leserahmen (ORF) für Gag auf Chromosom 3, für Pro auf Chromosom 6 und den bereits beschriebenen Env – ORF auf Chromosom 7q21.2 (Voisset et al., 2000). In einem Westernblot mit HERV-W Gag und Env Antikörpern konnten in gesundem Plazentagewebe Banden der vermuteten Größe nachgewiesen werden. Der Gag ORF, von welchem auch die Expression des entsprechenden Protein nachgewiesen wurde, kodiert eine vollständige membranassoziierte Domäne (MA) und eine fast vollständige Kapsid Domäne inklusive „major homology region“ (MHR) allerdings ohne Nukleokapsid. Das Nukleokapsid ist zwar für die Formation retrovirusartiger Partikeln nicht obligat, ein Mangel würde jedoch das Verpacken der assoziierten RNA in die Partikel beeinträchtigen (Voisset et al., 2000). Untersuchungen bezüglich der Expression von HERV-W haben ergeben, dass sich *gag*, *pol* und *env* Transkripte in einer Vielzahl von gesunden Geweben und Tumorzellkulturen nachweisen lassen, unter anderem auch im Gehirn (Yi et al., 2004).

2.3.4 Expression von MSR_V / HERV-W Proteinen und möglicherweise damit zusammenhängende Pathomechanismen

Bei der Transfektion verschiedener Zelllinien mit einem Expressionsvektor, welcher für den ORF des HERV-W 7q21.2 Envelope Proteins kodiert, kam es zu einer Bildung von Synzytien (= mehrkernigen Riesenzellen) (Blond et al., 2000). Weiterhin wurde belegt, dass diese Wirkung durch Interaktion von HERV-W Env mit dem Typ-D Retrovirusrezeptor zustande

kommt. Das von nun an als Syncytin-1 bezeichnete HERV-W Env Glykoprotein lässt sich in der Plazenta im Cytotrophoblast und vor allem im Synzytiotrophoblast nachweisen. Dies lässt auf eine physiologische Rolle für die Funktion der Plazenta schließen.

In einer 2004 erschienenen Arbeit wurde die Expression von HERV-W-*env* 7q21.2 mRNA und dem entsprechenden Protein, Syncytin-1, im Gehirn von Patienten mit MS und Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen untersucht (Antony et al., 2004). In den Gehirnen, der an MS Erkrankten, waren die HERV-W-*env* mRNA Level signifikant höher als bei den Kontrollen. Die Astrozyten und Mikroglia in akuten Läsionen von Individuen mit MS zeigten eine deutlich verstärkte Expression von Syncytin-1. Die experimentelle Expression von Syncytin-1 in humanen fetalen Astrozyten führte zu einer vermehrten Bildung des proinflammatorischen Interleukins IL-1 β . Wurden humane Oligodendrozyten mit Medium von Syncytin-1 transfizierten Astrozytenkulturen behandelt, so zeigte sich ein ausgeprägter zytopathischer Effekt.

Bereits zuvor war gezeigt worden, dass die Inokulation von MSRV Partikeln in PBL (peripheral blood lymphocytes) Kulturen von gesunden Spendern verschiedener HLA II Klassen, zu einer polyklonalen Aktivierung von T-Zellen mit V β 16 T-Zell-Rezeptor-Kette führte (Perron et al., 2001). In den mit MSRV behandelten PBL Kulturen wurde außerdem eine signifikant erhöhte Produktion der Zytokine IL-6 und Tumor-necrosis-factor α (TNF- α) festgestellt. Ein rekombinant hergestelltes HERV-W-Env Protein, basierend auf der, für diese Arbeit synthetisierten, mutmaßlichen MSRV-Sequenz AF331500 (siehe Kap. 6.2.1), führte in PBL Kulturen zu einer ähnlichen T-Zell Aktivierung wie die Infektion mit MSRV Partikeln. Dies deutet darauf hin, dass das durch die Sequenz AF331500 kodierte MSRV / HERV-W Env Protein superantigen-ähnliche Eigenschaften besitzt.

Bei dem Versuch diese superantigenen Eigenschaften von MSRV in einem Tiermodell zu zeigen, wurden „severe combined immunodeficiency“ (SCID) Mäusen humane Leukozyten transplantiert und ihnen anschließend intraperitoneal MSRV-Partikel injiziert (Firouzi et al., 2003). Die mit den retrovirus-artigen Partikeln infizierten Mäuse entwickelten innerhalb von 5 bis 10 Tagen akute neurologische Symptome und starben, während kein Kontrolltier erkrankte. Im Gehirn der erkrankten Tiere zeigten sich disseminierte Blutungen und in ihrer Milz ließen sich mRNA Transkripte von TNF- α und Interferon γ (IFN γ) nachweisen. Des Weiteren zeigte sich bei den infizierten Mäusen eine selektive Depletion von T-Zellen mit V β 16 Rezeptor während die V β 17 Subpopulation polyklonal und die V β 2 Subpopulation oligoklonal vermehrt waren. Ein Hinweis darauf, dass die beobachteten pathogenen Effekte tatsächlich durch T-Zellen vermittelt waren, ist die Tatsache, dass eine Entfernung der T-

Zellen aus dem PBMC-Leukozytentransplantat 14 von 16 Tiere, trotz der Inokulation mit MSRV Partikeln, vor der Entwicklung von Krankheitssymptomen bewahrte.

In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass gezeigt werden konnte, dass rekombinantes HERV-W-Env (basierend auf der Sequenz AF331500) humane Monozyten durch eine Interaktion mit dem CD14 Rezeptor und „Toll-like receptor“ 4 (TLR4) aus der Gruppe der für die angeborenen Immunabwehr wichtigen „pattern-recognition“ Rezeptoren, zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen anregte (Rolland et al., 2006). Außerdem löste das rekombinante Env-Protein die Reifung von dendritischen Zellen aus und befähigte sie die Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH-1 Zellen zu fördern.

Perron et al. untersuchten 2005 die Gehirne von Patienten mit MS und normalen Kontrollen mit Antikörpern welche gegen rekombinante MSRV / HERV-W Gag und Env Proteine gerichtet waren. Für die Herstellung der Anti-Gag Antikörper wurde die mutmaßliche MSRV-Sequenz AF123881 verwandt. Während in den Gehirnen der Kontrollen eine physiologische Expression von Gag in Neuronen beobachtet wurde, fand man bei Patienten mit MS eine Akkumulation von Gag – Antigen in den Axonen im Bereich von Entmarkungsherden der weißen Substanz. Des Weiteren wurde in MS-Herden eine ausgeprägte Anfärbung von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen mittels, gegen HERV-W Env gerichteter Antikörpern beobachtet (Perron et al., 2005). Während HERV-W Proteine auch bei Gesunden exprimiert werden, existiert offensichtlich in MS-Läsionen ein abweichendes Expressionsmuster.

Eine Reihe von Arbeitsgruppen konnten in den vergangenen Jahren auch eine vermehrte bzw. verstärkte Expression von MSRV / HERV-W mRNA Transkripten im Blut und auch Gehirn von Patienten mit MS nachweisen (Serra et al., 2001 / Nowak et al., 2003 / Mameli et al., 2007). Zusammenfassend legen die beschriebenen Ergebnisse nahe, dass die proinflammatorischen Eigenschaften von Syncytin-1 oder anderen MSRV / HERV-W Proteinen eine pathogenetisch relevante Rolle bei der MS spielen könnten.

2.4 Ziele dieser Arbeit

Trotz der sich häufenden Hinweise, welche eine Rolle von sowohl MSRV als auch HERV-W (Syncytin-1) für die MS nahelegen, ist der Ursprung von MSRV sowie die genaue Beziehung zwischen MSRV und HERV-W bislang unklar. Dies hat teilweise zur unscharfen Trennung der beiden Entitäten geführt und eine Diskussion über den möglichen Beitrag von sowohl MSRV als auch HERV-W bei der Pathogenese der MS stimuliert (u.a. Perron et al.,

2001 / Antony et al., 2004 / Rolland et al., 2006) Das als MSRV bezeichnete retrovirale Element ist durch einige überlappende cDNA Klone definiert (siehe Kap. 2.3.2). Die Sequenzen dieser cDNA Klone sind verwandt mit der HERV-W Familie aber bisher konnten keine HERV-W Proviren identifiziert werden, von welchen die Sequenzen stammen (Komurian-Pradel et al., 1999). Wie bereits beschrieben existiert bislang auch kein Klon welcher ein komplettes, infektiöses MSRV Genom enthält. Daher stellt sich eine Reihe von Fragen: Handelt es sich bei MSRV, wie z.B. bei exogenen Varianten von HERV's bei Tieren (siehe Kap. 2.2.2), um ein exogenes, infektiöses Retrovirus welches mit der endogenen HERV-W Familie eng verwandt ist? Oder könnte es sich bei MSRV alternativ um, von endogenen HERV-W Proviren abstammende Sequenzen handeln? Stellt MSRV überhaupt ein autonomes, replikationskompetentes Retrovirus dar?

Bislang sind nur begrenzte Informationen darüber verfügbar, welche HERV-W Loci im humanen Genom transkriptionsaktiv sind. Wir stellten uns daher die Frage welche HERV-W Proviren in PBMC's von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen Transkripte herstellen und wie diese im Verhältnis zu bekannten MSRV – Sequenzen stehen. Auf der Grundlage der bisherigen Forschung zu MSRV / HERV-W und speziell den potentiellen Eigenschaften eines MSRV / HERV-W Env Proteins als Superantigen konzentrierten wir uns bei unseren Analysen auf HERV-W-*env* Sequenzen. So soll eine Aussage darüber ermöglicht werden:

- I.) welche HERV-W-*env* Loci in humanen PBMCs überhaupt transkriptionsaktiv sind,
- II.) ob es einen Unterschied in dem Transkriptionsmuster von HERV-W-*env* Loci zwischen Patienten mit MS und Kontrollen gibt
- III.) und ob speziell bei Patienten mit MS die vormals als MSRV beschriebenen Sequenzen nachgewiesen werden können.

Auf der Basis der in Zusammenhang mit der Untersuchung der HERV-W Transkriptionsmuster gesammelten Erkenntnisse sollen anschließend die in der Literatur beschriebenen, möglicherweise auf ein neues, mit HERV-W verwandtes, exogenes Retrovirus zurückgehenden MSRV Sequenzen (Perron et al., 1997 / Komurian-Pradel et al., 1999) bezüglich ihrer Herkunft analysiert werden. Dabei sollen die von uns gesammelten Erkenntnisse über die Häufigkeit von *in-vitro* Rekombinationsereignissen bei der RT-PCR berücksichtigt werden (siehe Kap. 6.2).

3 Material

3.1 Bakterienstämme

E. coli – pMos – blue (pMos – blue T-vector Kit, Amersham) wurden zur Transformation und Klonierung mit dem pGem – T – Vektor genutzt.

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) wurden zur Transformation und Klonierung mit dem pCR®2.1-TOPO® Vektor (Invitrogen) genutzt.

3.2 Größenmarker

1 – Kb plus DNA Marker (Invitrogen) mit Fragmenten der Größen 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.65, 1, 0.85, 0.65, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 und 0.1 kB

1 – Kb DNA Marker (Invitrogen) mit Fragmenten der Größen 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12226 bp

3.3 Chemikalien, Puffer und Medien

Alle, nicht speziell in der unten aufgeführten Liste enthaltenen, Chemikalien wurden von den nachfolgenden Firmen in reiner Form bezogen:

Sigma Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Biozym (Rockland, USA), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt).

Agarose (Invitrogen)

0,1 M DTT (Invitrogen)

Lieferung mit SuperScript II RT (Invitrogen)

Blaumarker

Glycerin (50%); EDTA (50mM); Bromphenolblau (0,25%)

BSA 10 mg / ml (New England Biolabs) (Cat. No. B9001S)

20 mM KPO₄, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% Glycerol, pH 7.0

EDTA-Stammlösung	74,448g auf 1000ml Aqua dest.
5x First Strand Buffer (Invitrogen)	250mM Tris-HCL, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , pH 8,3 Lieferung mit SuperScript II RT (Invitrogen)
Fötale Kälberserum (=FCS), (Biochrom)	
Inkubationspuffer 10x, DNase I (Roche) (Cat.No. 04 716 728 001)	400mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , pH 7,9
IPTG 0,1M	(1,2 g IPTG in 50 ml AquaDest)
LB-Agar (Becton & Dickinson)	20g LB-Agar auf 500ml Aqua dest.
LB-Medium (Becton & Dickinson)	12,5g LB-Bouillon auf 500ml Aqua dest.
LB-Medium oder LB-Agar mit Ampicillin (Ratiopharm)	0,1mg Ampicillin pro Milliliter Medium
NEBuffer 1 (New England Biolabs) (Cat. No. B7001S)	10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.0
NEBuffer 2 (New England Biolabs) (Cat. No. B7002S)	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9
NEBuffer 4 (New England Biolabs) (Cat. No. B7004S)	50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM Mg-Acetat, 1mM Dithiothreitol, pH 7.9
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	500ml Stammlösung A; 500ml Stammlösung B; Aqua dest. ad 5l
Penicillin / Streptomycin	Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml

10x PCR – Puffer (Sigma)	100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl ₂ , 0,01 % Gelatine, pH 8,3
pCR 2.1-TOPO Vektor	10 ng/μl Plasmid DNA in 50% Glycerol, 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 μg/ml BSA, Phenolrot, pH 7.4
2x Rapid ligation Puffer (Promega)	60mM Tris-HCL, 20 mM MgCl ₂ , 20 mM DTT, 2mM ATP, 10 % Polyethylenglykol Lieferung mit Promega pGEM-T Kit
RPMI 1640 Zellkulturmedium (GIBCO)	
S.O.C. Medium	2% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, auf 1 l Aqua Dest. pH 7,0
50 fach TAE-Puffer	242,18g Tris-Puffer (2M); 20,5g Na-acetat (0,25M); 18,6g EDTA; 50ml Essigsäure
1 fach TAE-Puffer	50 fach TAE-Puffer mit Aqua dest. 1:50
10 x TURBO DNase Puffer (Ambion)	Lieferung mit TURBO DNA-free Kit
T4-DNA-Ligase-Puffer	ATP (10mmol/l); MgCl ₂ (50mmol/l); Dithiothreitol (DTT, 10mmol/l); Tris-HCl (600mmol/l, pH 7,5)
X-Gal	100 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid gelöst in 2 ml N,N'-dimethylformamid

3.4 Laborgeräte und andere Materialien

3.4.1 Geräte

PCR-Gerät: MJ Reseach, Peltier Thermal Cyclers PTC 200

Zellzählung: Schärfe System, Casy 1

Abzug: Waldner Electronics, FAZ 3

Tischzentrifuge: Heraeus Christ, Biofuge A

Zentrifuge: Heraeus Instruments, Megafuge 1R

Vortexer: RLabin, Duo Press_to_mix

Wasserbad: BBraun, Thermomix ME

Datenverarbeitung: Fujitsu Siemens Amilo A 1630 PC

3.4.2 Kits

Nucleospin Extract II, 50 Reaktionen, Macherey und Nagel, Cat. No. 636972

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit, 200 Reaktionen, PEQLAB, Cat. No. 12-6942-02

pGEM-T Vector System I, 20 Reaktionen, Promega, Cat. No. A3600

QIAshredder, 50 Säulen, Qiagen, Cat. No. 79654

QIAprep Spin Miniprep Kit, 250 Reaktionen, Qiagen, Cat. No. 27106

RNeasy Mini, 50 Reaktionen, Qiagen, Cat. No. 74104

TOPO TA Cloning® Kit, 20 Reaktionen, Invitrogen, Cat. No. K4500-01

3.5 Enzyme und dNTP's

BsrGI Restriktionsenzym	New England Biolabs (Cat. No. R0575S)
DNase I recombinant, RNase free	Roche (Cat. No. 04 716 728 001)
KpnI Restriktionsenzym	New England Biolabs (Cat. No. R0142S)
NdeI Restriktionsenzym	New England Biolabs (Cat. No. R0111S)
peqGOLD dNTP-Set	PEQLAB (Cat. No. 20-2011)
Protector RNase Inhibitor	Roche (Cat. No. 03 335 399 001)
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Cat. No. 18064-022)

Superscript III Reverse Transkriptase

Invitrogen (Cat. No. 18080-093)

Taq Polymerase A

Sigma (Cat. No. D6677-250 UN)

Turbo DNase (in DNA-free DNase Kit)

Ambion (Cat. No. AM1906)

T4-DNA-Ligase (in pGEM-T Vector System)

Promega (Cat. No. A3600)

3.6 Oligonukleotide (Operon, TIB-Molbiol)

Die hier aufgelisteten Primer wurden zur Herstellung von PCR Amplifikaten und anschließenden Klonierung verwendet.

Zielgen	Oligonukleotidsequenz 5' – 3'		Größe des Amplikons (bp)	Anzahl der amplifizierten proviralen Loci*
HERV-W env	sense: MS/HERV-U antisense: Nell-env-R	5'-TTC ACT GCC CAC ACC CAT-3' 5'-GAG GTA CCA CAG ACA AAA AAT ATT CCT-3'	641	9
HERV-W env Xq22	Sense: Xq22StopFlank Antisense: Xq22spezATT	5'-GCT GCT GTA CAA CCA GTA GCT C-3' 5'-TTC TCT TGC CTG ACC TTG AAT-3'	305	1
HERV-W env Xq22 genom.	Sense: Xq22genfwd Antisense Xq22genre	5'-AAA TGT GGA CAA TGC ACA TAA CA-3' 5'-GCA TGC TCA CTG CTA AAG GA-3'	2134	1

Tabelle 1: Übersicht über die für die PCR verwandten Oligonukleotidkombinationen. Die jeweilige Primerbezeichnung steht in der zweiten Spalte (fett). Mit Hilfe des online Programmes "UCSC In-Silico PCR" (<http://hgw4.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) wurde die Größe und Anzahl der mit der jeweiligen Oligonukleotidkombination amplifizierbaren Loci im humanen Genom berechnet. Die angegebene Anzahl der amplifizierbaren proviralen Loci umfasst nur solche mit 100 prozentigen Treffern des Sense-Primers.

3.7 Vektoren

3.7.1 pGem-T-Vektor (Promega)

Der pGEM-T Vektor ist ein bakterieller Expressionsvektor, welcher zur Klonierung von PCR Produkten benutzt wird. An beiden Enden des Vektors befinden sich überhängende Thyminreste. An diese können sich die PCR-Amplifikate anlagern, da die Taq-Polymerase allen Amplifikaten am 3'-Ende ein Desoxyadenosin anhängt. Durch den Thyminrest an beiden Enden wird auch einer Rezirkularisation des Vektors ohne Insert vorgebeugt. Die Klonierungsstelle liegt in einem für die β -Galaktosidase kodierenden Bereich, wodurch ein „Blue-White –Screening“ ermöglicht wird. Ist ein amplifiziertes Fragment in den Vektor integriert, so wird das lacZ-Gen ausgeschaltet und die Bakterienkolonie, welche ein Insert enthält erscheint auf der Agarplatte weiß, wohingegen Kolonien, die ein intaktes lacZ-Gen enthalten, bläulich erscheinen. Weiterhin kodiert der Vektor für ein Resistenzgen von Ampicillin, welches der Selektion transformierter Bakterien dient.

3.7.2 pCR 2.1-TOPO Vektor

Der pCR 2.1-TOPO Vektor ist ebenfalls ein bakterieller Expressionsvektor, welcher zur Klonierung von PCR Produkten benutzt wird. An beiden Enden des linearisierten Vektors befinden sich 3' Thyminreste mit kovalent gebundener Topoisomerase I des Vaccinia Virus. Mit Hilfe der in der kovalenten Bindung zur Topoisomerase gespeicherten Energie kann ein PCR Produkt mit Desoxyadenosinrest in einer nur fünfminütigen Reaktion, ohne Verwendung einer Ligase, ligiert werden (Shuman, 1994). Wie beim pGEM-T Vektor ist ein Blue-White-Screening für rekombinante Klone möglich.

3.8 Zelllinien

3.8.1 B-Zelllinien

BLCL-M BLCL-KR, BLCL-L: B-lymphoblastoide Zelllinien welche aus PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) von Mitarbeitern hergestellt wurden. Eine Immortalisierung wurde durch Transformation mit EBV-B95-8 erzielt.

BLCL-297/03: B-lymphoblastoide Zelllinie welche aus PBMCs einer 32 jährigen Patientin mit Multipler – Sklerose hergestellt wurde. Eine Immortalisierung wurde durch Transformation mit EBV-B95-8 erzielt

3.9 Klonierungen

3.9.1 HERV-W-*env* Transkriptionsmusteranalyse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von vier Multiple Sklerose Patienten und vier gesunden Kontrollen die folgenden Klonierungen durchgeführt. Zunächst wurden die proviralen Zielgene mittels RT-PCR mit den Primern MS/Herv-U und Nell-*env*-R amplifiziert und anschließend die entstandenen Fragmente in den pGEM-T bzw. pCR 2.1-TOPO Vektor kloniert (siehe Kap. 5.2.9) um dann jeweils mindestens 40 Klone zu sequenzieren.

Klonierung	Probe
MS-I	PBMC 297/03 cDNA
MS-II	PBMC 197/02 cDNA
MS-III	PBMC 176/02 cDNA
MS-IV	PBMC 321/03 cDNA
KO-I	PBMC KT-22 cDNA
KO-II	PBMC KT-9 cDNA
KO-III	PBMC KT-5 cDNA
KO-IV	PBMC K4/03 cDNA

Tabelle 2: Zuordnung der Klonierungen im Rahmen der HERV-W-*env* Transkriptionsmusteranalyse zu den dabei verwandten PBMC Proben

3.9.2 Screening auf Mutationen im HERV-W-*env* Xq22.3 Stop Codon

Die folgenden Klonierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung eines spezifischen Stop Codons im HERV-W-*env* Locus auf Chromosom Xq22.3 hergestellt. Das Zielgen wurde mittels einer zwei Schritte umfassenden „Nested – PCR“ zunächst mit den Primern Xq22genfwd und Xq22genrev sowie darauffolgend mit den Primern Xq22StopFlank und Xq22spezATT amplifiziert (siehe Kap.6.4). Anschließend wurde das entstandene Fragment in den pGEM-T Vektor kloniert um es zu sequenzieren.

Klonierung	Patientenprobe	Klonierung	Kontrollprobe
MS-1*	BLCL 297/03 gDNA	KO-1	PBMC KT-22 gDNA
MS-2	PBMC 176/02 gDNA	KO-2	BLCL-KR gDNA
MS-3	PBMC 321/03 gDNA	KO-3	PBMC-KT-5 gDNA
MS-4	PBMC 289/02 gDNA	KO-4	PBMC KT-21 gDNA
MS-5	PBMC 247/03 gDNA	KO-5	PBMC K-14 gDNA
MS-6	PBMC 00/359 gDNA	KO-6	PBMC KT-2 gDNA
MS-7	PBMC 148/02 gDNA	KO-7	PBMC KT-14 gDNA
MS-8	PBMC 76/02 gDNA	KO-8	PBMC KT-19 gDNA
MS-9	PBMC 200/02 gDNA	KO-9	PBMC KT-7 gDNA
MS-10**	PBMC 197/02 cDNA	KO-10	PBMC KT-4 gDNA

Tabelle3: Übersicht über die im Rahmen des Screenings auf Mutationen eines Stop Codons im HERV-W-*env* Xq22.3 Locus erfolgten Klonierungen und die dabei verwandten Proben. Die mit * markierte Klonierung erfolgte ohne Nested-PCR direkt unter Verwendung der Primer Xq22genfwd und Xq22genrev. Die mit ** markierte Klonierung erfolgte unter Verwendung von cDNA, da keine gDNA zur Aufreinigung zur Verfügung stand.

3.9.3 Weitere Klonierungen

MS-4b: PBMC 289/02 cDNA, Primer: Xq22StopFlank und Xq22spezATT

ATT+RT: PBMC K4/03 cDNA aus Gen spezifischer RT, Primer für „HERV-W-*env* Xq22“

3.10 Computersoftware und Webseiten

Im Rahmen der Ergebnisanalyse und Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Software und Webseiten genutzt:

- Microsoft Windows XP-Home Edition und Microsoft Office 2003
- Mozilla Firefox 2.0.0.8
- Ulead Photo Impact 5.0 (Grafikbearbeitung)
- Muscle 3.6 – multiple sequence alignment software (Edgar, 2004)
- Human Blat Search: <http://genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat>
- BOXSHADE 3.21: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
- Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (Literaturrecherche und Sequenzdatenbank)

4 Patienten und gesunde Kontrollen

Die Blutprobenentnahme von Patienten mit Multipler Sklerose und gesunden Kontrollen wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt. Alle Teilnehmer haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die im Rahmen dieser Arbeit verwandten PBMC Proben wurden während einer vorangegangenen Untersuchung asserviert (Gronen et al., 2006). Die Blutproben der Patienten stammen von 10 Personen mit Multipler Sklerose, welche sich in der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg in regelmäßiger Behandlung befanden. Die klinischen Angaben wurden den Patientenakten entnommen. Multiple Sklerose wurde gemäß den Poser Kriterien diagnostiziert (Poser et al., 1983) und als schubförmig remittierende (RRMS), sekundär progrediente (SPMS) und primär progrediente Multiple Sklerose (PPMS) kategorisiert. Die Blutproben der 12 gesunden Kontrollen stammen von Klinikmitarbeitern bzw. potentiellen Knochenmarkspendern aus der Datenbank des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämatologie der Universität Würzburg. Die in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Patienten waren entweder unbehandelt (n=4) oder erhielten eine Therapie mit Glatirameracetat (Copaxone®; n=4) bzw. Interferon (IFN)- β (n=2). Keiner der Patienten hatte im Verlauf der letzten 6 Monate vor Blutentnahme eine Kortisontherapie erhalten.

Etwa 40 ml periphervenöses Blut wurde mit EDTA-Röhrchen entnommen. Die enthaltenen PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) wurden mittels Lymphoprep Gradientenzentrifugation (Axis Shield, Oslo, Norway) isoliert. Nach der Isolierung wurden die Zellen einmal in PBS (Biochrome AG, Berlin) gewaschen, für die spätere Verwendung eingefroren und bei -70°C gelagert. Aus den in der folgenden Tabelle aufgelisteten Proben wurden mittels RNA Extraktion und Reverser Transkription cDNA hergestellt. Die cDNA von vier Patienten- und vier Kontrollen (*) wurde anschließend hinsichtlich des Transkriptionsmusters von HERV-W-*env* Loci mittels Klonierung und Sequenzierung genauer untersucht (siehe Kap. 6.1.5). Des Weiteren wurde genomische DNA aufgereinigt welche zur Suche nach einer Punktmutation eines Stop-Codons des *env* Locus der HERV-W Kopie auf Chromosom Xq22.3 genutzt wurde (siehe Kap. 6.4).

Patientenkürzel	MS-Typ	EDSS	Therapie	Monate nach Kortisontherapie	Alter (Jahre)	Geschlecht	Sequenzbezeichnungen Transkriptionsanalyse	Sequenzbezeichnungen Stop-Codon-Suche
297//03 *	RR	1,5	Glatirameracetat	6	32	W	MS-I	MS-1
197/02 *	RR	2	Interferon beta-1a	6	39	W	MS-II	MS-10**
176/02 *	RR	4,5	Glatirameracetat	12	36	M	MS-III	MS-2
321/03 *	SP	6,5	keine	84	29	W	MS-IV	MS-3
289/02	RR	3,5	Interferon beta-1a	24	37	W		MS-4
247/03	RR	4	Glatirameracetat	24	34	M		MS-5
00/359	SP	3,5	keine	12	50	W		MS-6
148/02	PP	8	keine	>24	43	W		MS-7
76/02	PP	8,5	keine	12	54	W		MS-8
200/02	RR	1,5	Glatirameracetat	6	30	M		MS-9

Durchschnittsalter: 38,4 3 m, 7 w

Tabelle 4: Übersicht über die klinischen Daten des Patientenkollektivs und die Nomenklatur der mit den jeweiligen Proben durchgeführten Klonierungen. * für die Transkriptionsmusteranalyse verwendete Patientenproben. ** keine gDNA verfügbar, Screening auf Stop-Codon-Mutation in cDNA

EDSS = Expanded Disability Status Scale, Score zum Messen der Schwere der durch die Erkrankung bedingten Behinderung, reicht von 0 = normale neurologische Funktionen bis 10 = Tod durch die Erkrankung bedingt

RR = relapsing remitting (schubförmig remittierend)

SP = secondary progressive (sekundär progredient)

PP = primary progressive (primär progredient)

Kürzel Kontrolle	Alter	Geschlecht	Sequenzbezeichnung Transkriptionsmusteranalyse	Sequenzbezeichnung Stop-Codon-Suche
KT-22*	34	W	KO-I	KO-1
KT-9*	41	M	KO-II	**
KT-5*	35	M	KO-III	KO-3
K4/03*	29	W	KO-IV	**
KT-11	36	M		KO-2***
KT-21	42	W		KO-4
K-14	33	M		KO-5
KT-2	40	W		KO-6
KT-14	55	W		KO-7
KT-19	43	W		KO-8
KT-7	38	W		KO-9
KT-4	27	M		KO-10

Durchschnittsalter: 37,8 5 m, 7 w

Tabelle 5: Übersicht über Alter und Geschlecht der Kontrollpersonen sowie die Nomenklatur der mit den jeweiligen Proben durchgeführten Klonierungen. * für die Transkriptionsmusteranalyse verwendete Kontrollproben. ** keine gDNA Aufreinigung erfolgt. *** aus EBV transformierten B-Zellen aufgereinigte DNA

5 Methoden

5.1 Zellkulturtechniken

5.1.1 Auftauen der PBMC – Proben

Zum Auftauen der PBMCs wurden die Kryokonservierungsröhrchen dem Gefrierschrank entnommen und schnell bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml vorgewärmtem RPMI 1640 Zellkulturmedium aufgenommen, darin resuspendiert und 10 min bei 1200/min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes folgte ein weiterer Waschschrift mit 20 ml Zellkulturmedium. Abschließend wurde das Zellpellet in 20ml RPMI 1640 mit Penicillin / Streptomycin und 10 % FCS resuspendiert. Die nicht mehr aufzulösenden Anteile des Pellets (Zelldebris) wurden mittels einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen und zur späteren DNA-Extraktion bei -20°C tiefgefroren. Die im Zellkulturmedium enthaltenen PBMC's wurden in eine Zellkulturflasche transferiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

5.1.2 Bestimmung der Zellzahl mittels des CASY-Zellzählers

Um für den folgenden Schritt der RNA Extraktion die notwendige Menge an Lysispuffer zu ermitteln, war eine Bestimmung der eingesetzten Zellzahl notwendig. Diese wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY TT vorgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden in 10 ml Casyton (Elektrolytlösung des Herstellers) aufgenommen. Die gemessenen Zellen wirken im leitenden Medium als Isolator und verändern damit beim Durchtritt durch die Messzelle den elektrischen Widerstand was Rückschlüsse auf Zelldichte und Größenverteilung erlaubt.

5.2 Nukleinsäuretechniken

5.2.1 RNA Extraktion

Zur Isolierung der RNA aus den PBMC Proben wurde der RNeasy-Mini Kit der Firma Qiagen verwandt. Diese Säulenpräparationstechnik basiert auf der Bindung der RNA an eine Silicagel-Membran, an welche bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 Nukleotiden binden kann. Zunächst wurden die im Nährmedium suspendierten Zellen mittels Zentri-

fugation (10 min bei 1200/min) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen unmittelbar mit einem stark denaturierenden, Guanidinisothiocyanat (GITC) und β -Mercaptoethanol (β -ME) enthaltenden Puffer lysiert. Dieser Puffer inaktiviert enthaltene RNAsen, so dass die Isolierung einer intakten RNA gewährleistet war. Anschließend wurde das Lysat mittels QIAshredder Säulen (Quiagen) homogenisiert um eine effektive Bindung der RNA an die Membran zu gewährleisten. Nach der Zugabe von Ethanol wurde die Probe auf die RNeasy Mini-Säule aufgetragen. Die RNA bindet an die Membran, während die übrigen Substanzen nach dem Protokoll des Herstellers durch mehrer Zentrifugations- und Waschschrte entfernt wurden. Die RNA wurde abschließend in 60 μ l RNase freiem Wasser eluiert.

5.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels Absorptionsspektroskopie im Photometer bestimmt. DNA Proben wurden in einer Verdünnung von 1:100 und RNA Proben in einer Verdünnung von 1:50 in Aqua dest. gemessen. Die konjugierten Doppelbindungen in den Basen von Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei etwa 257 nm. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei etwa 280 nm auf. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Extinktion in die Nukleinsäurekonzentration umgerechnet werden. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Lösung zu. Optimale Werte für DNA liegen zwischen 1,65 und 1,85. Niedrigere Werte weisen auf eine Proteinverunreinigung, höhere auf eine RNA Verunreinigung hin. Die optimale Ratio von RNA liegt zwischen 1,9 und 2,2.

5.2.3 DNase Verdau

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu ermitteln welche der ausgewählten HERV-W-*env* Loci transkriptionsaktiv sind. Daher war es notwendig sicherzustellen, dass in der folgenden PCR Reaktion keine genomische DNA amplifiziert wurde. Dies wurde durch einen vollständigen DNase Verdau des RNA-Extraktes aus dem vorangegangenen Schritt erreicht. Um eine Kontamination der Proben mit anderweitiger DNA zu vermeiden wurden sowohl der DNase Verdau als auch die folgende PCR Reaktion mit größter Vorsicht an der Sterilbank pipettiert. Zu Beginn der Experimente wurde für den DNase Verdau DNase I von Roche nach folgendem, vom Hersteller abweichenden, Reaktionsschema verwandt:

RNA-Extrakt	40 µl
10x Inkubationspuffer	5 µl
RNAse Inhibitor	2 µl
DNase I 30 units	3 µl

50 µl

Tabelle 6: Pippetierschema DNase Verdau, DNase I, Roche

- Zunächst umpipetieren des RNA-Extraktes in ein steriles Reaktionsgefäß
- Hinzufügen von Inkubationspuffer und RNAse Inhibitor und zentrifugieren (30s bei 6000/min)
- Hinzufügen der DNase und Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 45 min
- Stoppen der Reaktion durch Hinzufügen von 2 µl EDTA 0,2M
- Hitzeinaktivierung der DNase im Wasserbad bei 75°C für 10 min
- Zentrifugieren, 1 min bei 6000/min und Kühlen auf Eis

Später wurde auf die Verwendung von Turbo DNase (Ambion) umgestellt. Bei dieser, durch eine höhere katalytische Effektivität gekennzeichneten, DNase entfällt die Hitzeinaktivierung und das Hinzufügen von EDTA zum Stoppen der Reaktion. Das folgende intensivierete Reaktionsschema wurde verwandt:

10 µg RNA plus	
Aqua dest. RNA-frei	ad 43 µl
10x Turbo-DNase-Puffer	5 µl
Turbo DNase	2 µl
Inaktivierungsreagenz	10 µl

60 µl

Tabelle 7: Pippetierschema DNase Verdau, Turbo DNase, Ambion

- Vorlegen des RNA-Extraktes (10 µg RNA) in Aqua dest. ad 43 µl
- Hinzufügen des 10x Inkubationspuffers und zentrifugieren (30s bei 6000/min)
- Hinzufügen von 1 µl Turbo DNase und Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 30 min

- kurzes Zentrifugieren und hinzufügen von 1 µl Turbo DNase
- Inkubation bei 37°C für 30 min
- Zugabe von 10 µl Inaktivierungsreagenz und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min
- Abzentrifugieren des Inaktivierungsreagenz bei 12000/min für 1,5 min
- Abpipetieren von 42 µl des Überstandes in ein steriles Reaktionsgefäß, Kühlen auf Eis

5.2.4 Reverse Transkription

5.2.4.1 Reverse Transkription der gesamt – RNA

Zur Amplifikation der isolierten RNA mittels PCR musste die einzelsträngige RNA mit Hilfe einer retroviralen Reversen Transkriptase in eine komplementäre copy DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese cDNA diente bei der PCR als Matrize. Um eine Verunreinigung mit verbleibender genomischer DNA ausschließen zu können, erfolgte parallel eine RT-minus Kontrolle. Dafür wurde je Probe ein Reaktionsgefäß ohne Zugabe der reversen Transkriptase parallel prozessiert. Die Synthese der cDNA erfolgte mit 0,3 bis 0,5 µg RNA mittels der M-MLV Reversen Transkriptase („Superscript II“ Invitrogen) in Anwesenheit von Hexaoligonukleotiden mit zufälliger Sequenz (random hexamers) nach folgendem Reaktionsschema:

RNA und Aqua dest.	ad 11µl
random hexamers	1 µl
RT dNTP Mix	1 µl

Tabelle 8a: Pippetierschema Reverse Transkription

- Inkubation bei 65°C für 5 min um Basenpaarungen innerhalb einzelsträngiger RNA aufzulösen
- Kurzes Abkühlen auf Eis und hinzufügen von:

5x First-Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl

Tabelle 8b: Pippetierschema Reverse Transkription

- Vorsichtiges Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min

- In die RT-plus Proben hinzufügen von:

Superscript II RT	1 μ l
-------------------	-----------

Tabelle 8c: Pippetierschema Reverse Transkription

- Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min
- Inkubation bei 42°C für 60 min
- Hitzeinaktivierung bei 75°C für 10 min und anschließende Lagerung bei -20°C

5.2.4.2 Gen – spezifische Reverse Transkription

Zur Bestimmung der Transkriptionsrichtung des HERV-W-*env* Xq22.3 Locus wurde eine Reverse Transkription mit genspezifischen Primern durchgeführt. Hierzu wurden getrennte Reaktionsansätze mit entweder nur dem Xq22StopFlank bzw. nur dem Xq22spezATT Primer prozessiert um einen Rückschluss auf die Transkriptionsrichtung der mRNA zu ermöglichen (siehe Abb. 18). Abweichend vom Schema der RT für die gesamt – RNA (Kap. 5.2.4.1) wurde hier die Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) mit höherer Thermostabilität verwandt. Hierdurch konnte eine höhere Reaktionstemperatur von 55°C für 45 min gewählt und damit eine gesteigerte Spezifität gewährleistet werden.

5.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5.2.5.1 Konventionelle PCR

Dieses 1983 von Kary Mullis entwickelte und dann durch Saiki (Saiki et al., 1985) beschriebene Verfahren ist heute eine Standardtechnik um ausgewählte DNA-Fragmente *in-vitro* zu vervielfältigen. Die Reaktion läuft in drei charakteristischen Schritten ab, welche sich in bis zu 45 Zyklen wiederholen: die Denaturierung, d.h. Aufspaltung des DNA-Doppelstranges, das Annealing (Aneinanderlagern) der Primer an die Matrizensequenzen und die Elongation des DNA-Komplementärstrangs durch die eine hitzestabile Polymerase. Zunächst wird bei Temperaturen von 94-96°C der DNA-Doppelstrang der Ausgangs-DNA (template) aufgeschmolzen (denaturiert). Während des folgenden Schritts, dem Annealing lagern sich bei Temperaturen von ca 55-65°C die sequenzspezifischen Oligonukleotide (sense und antisense Primer), die zum 5'- bzw. 3'- Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, an beide Enden des Templates an. Im dritten Schritt, der Elongation, wird der komplementäre DNA-Strang durch eine hitzestabile (Taq)-Polymerase synthetisiert, deren maximale En-

zymaktivität bei Temperaturen zwischen 68 und 72°C liegt. Auf diese Art findet beim Hintereinanderschalten mehrerer Zyklen eine exponentielle DNA-Amplifikation statt.

Für die in dieser Arbeit vorgenommenen PCR-Reaktionen wurden meist 50 µl Ansätze verwendet, welche wie folgt zusammengesetzt waren:

Template DNA	0,3-3 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
Sense-Primer (25µM)	1 µl
Antisense Primer (25µM)	1 µl
dNTP-Mix (je 0,2mM)	1 µl
Taq Polymerase A	0,3 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Tabelle 9: Pippetierschema PCR – Ansatz

Für die Amplifikation wurde ein Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ Research mit den Programmen KR 58_35 bzw. KR 58_40 (35 bzw. 40 Zyklen) genutzt:

1. 95°C, 3 Minuten
2. 95°C, 50 Sekunden (Denaturierung)
3. 58°C, 50 Sekunden (Annealing)
4. 72°C, 1 Minute (Elongation)
5. Wiederholung der Schritte 2.-4. entsprechend der Zyklenzahl
6. 72°C, 10 Minuten
7. 4°C, ∞

5.2.5.2 Nested PCR

Für die Klonierung des HERV-W-*env* Xq22 Gens im Rahmen der Untersuchung des Stop-Codons wurde eine sogenannte Nested-PCR mit zwei Amplifikationszyklen durchgeführt. Zunächst wurde mit Primern, welche im flankierenden Bereich des Gens auf dem X Chromosom liegen (Xq22genfwd und Xq22genrev) ein 2134 bp großes Template amplifiziert. In eine anschließende zweite PCR wurden als Template 0,3 µl des PCR-Produktes der ersten

PCR eingesetzt. Mit Hilfe von, für das HERV-W-*env* Xq22 Gen spezifischen, Primern (Xq22StopFlank und Xq22spezATT), welche innerhalb des ersten PCR-Produktes liegen, wurde ein 305 bp großes Fragment amplifiziert, welches dann kloniert wurde.

5.2.6 Reinheitsbestimmung der komplementären DNA (cDNA)

Die untersuchten HERV-W-*env* Sequenzen kommen in jeder genomischen DNA in mehrfacher Kopie vor. Somit würden bereits geringe Kontaminationen die Aussagekraft der Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von mRNA-Transkripten dieser Gene zunichte machen. Um dies zu vermeiden wurden die RNA Extraktion und Aufarbeitung der Plasmid-DNA räumlich getrennt von der Detektion mittels PCR durchgeführt. Jeder Arbeitsschritt erfolgte unter strenger Beachtung der Sterilität. Die PCR wurde in einem eigens dafür vorgesehenen Bereich, in der Abteilung für die klinische Virus-Diagnostik, vorbereitet. Das Pipetieren des Prämixes und die anschließende Probenzugabe erfolgten an räumlich getrennten Arbeitsplätzen. Bei jeder PCR-Reaktion erfolgte eine Wasserkontrolle und nur bei eindeutig negativem Ergebnis wurde die PCR als valide gewertet. Um eine Kontamination der cDNA mit externer genomischer DNA bzw. Resten der probeneigenen genomischen DNA auszuschließen, wurde eine Minus-Kontrolle ohne Zugabe von Reverser Transkriptase prozessiert. Diese RNA-minus-RT Probe wurde ebenfalls parallel zur hergestellten cDNA einer PCR unterzogen. Nur wenn nach 40 Zyklen auf dem Agarosegel in dieser Probe keine Amplifikate zu erkennen waren wurde die cDNA als rein eingestuft und zur Klonierung verwandt.

5.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine gebräuchliche Methode zum Auftrennen von DNA-Fragmenten, aufgrund ihrer Eigenschaft als Polyanionen, im elektrischen Feld über einem Agarosegel. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt von ihrer Größe, der Agarosekonzentration im Gel und der angelegten Spannung ab. Für Fragmente von 300 bis 1000 bp wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Konzentration von 2,5 % gewählt, für Fragmente von 1000 bis 2200 bp eine Agarosekonzentration von 1,5 %. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge Agarosepulver in 1x TAE Puffer gegeben und die Lösung in einem Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg

pro ml Lösung) hinzugegeben, welcher mit dem DNA-Doppelstrang interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Das Gel wurde unter einem Abzug in einen Rahmen mit vorbereiteten Kämmen, welche die Taschen für die DNA-Proben formen, gegossen. Nach ca. 30 min bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert und konnte verwandt werden. Die DNA-Proben wurden mit 20% Blaumarker versetzt um die Laufstrecke verfolgen zu können und in die Taschen des Gels pipettiert. In die erste Tasche wurde ein DNA-Molekülgewichtsmarker (1 kb (plus) DNA ladder) gegeben um die Größe der DNA Banden später abschätzen zu können. In einer, mit 1x TAE-Puffer gefüllten, Elektrophoresekammer wurden die DNA-Fragmente bei Gleichspannungswerten von maximal 120 V entsprechend ihrer Ladung und Molekülgröße aufgetrennt. Das Ergebnis wurde photographisch unter kurzwelligem UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) dokumentiert.

5.2.8 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel

Nach der Trennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese wurden bestimmte Fragmente für die Klonierung aus dem Gel isoliert. Zunächst wurde hierzu das Agarosegel, um Schäden der DNA durch das kurzwellige UV-Licht zu vermeiden, auf einem UV-Schirm mit der Wellenlänge $\lambda=366\text{nm}$ betrachtet und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem Nucleospin-Extract-II Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie. Zunächst wurde das Agarosestück in einem Puffer im Wasserbad bei 50°C geschmolzen. Anschließend, wurde die Lösung auf die Ionenaustauschsäule pipettiert. Bei der folgenden Zentrifugation band die negativ geladene DNA an die positiv geladene Säule. Nach einem Waschschrift wurde die DNA in $20\ \mu\text{l}$ vorgewärmten Aqua dest. eluiert.

5.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die aus dem Agarosegel aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in den pGEM-T bzw. pCR 2.1-TOPO Vektor ligiert. Beide Vektoren besitzen überhängende Thymidinreste wodurch PCR-Amplifikate mit 3'-Desoxyadenosin-Resten ohne Zuhilfenahme von Restriktionsenzymen ligiert werden können (siehe Kap. 3.7). Die Vektorsysteme wurden gemäß Herstellerangaben, im Falle des pGEM-T Systems mit einer Inkubation bei 4°C über Nacht (ca 16 Stunden), nach folgendem Schema angewandt:

DNA-Gel-Eluat	3 μ l
2x Rapid ligation Puffer	5 μ l
pGEM-T Vektor, linearisiert	1 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l

Tabelle 10: Pippetierschema pGEM-Ligation

DNA-Gel-Eluat	4 μ l
pCR 2.1-TOPO Vektor	1 μ l
Salzlösung	1 μ l

Tabelle 11: Pippetierschema Topo-Ligation

5.2.10 Analytische Plasmidaufarbeitung

Nach der Transformation von Bakterien mit Plasmiden, welche ein gewünschtes Fragment als Insert trugen, wurde in diesem Schritt die Plasmid-DNA aufgereinigt. Die von einer Bakterienkolonie gewonnene Plasmid-DNA trägt immer nur ein definiertes, kloniertes DNA-Fragment, welches dann im nächsten Schritt zur Sequenzierung verwandt wurde.

Als erstes wurden weiße, ein Plasmid mit Insert enthaltene Bakterienkolonien nach der Inkubation der Agarplatte (Kap. 5.3.1) mit einer Pipettenspitze aufgenommen und 3 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Diese, je auf eine Bakterienkolonie zurückgehenden Bakterienkulturen wurden wiederum 14-18 Stunden bei 37°C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und die Bakterien für 3 Minuten bei 8000/min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach abgießen des Überstandes wurde die enthaltene Plasmid-DNA mit dem QIAprep Miniprep Kit von Quiagen aufgereinigt. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien gefolgt von der Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silica-Membran in einer Zentrifugensäule. Anschließend wurden mehrere Waschschrte durchgeführt um RNA, zelluläre Proteine und anderen Zelldebris zu entfernen bevor die DNA in 50 μ l Aqua dest. eluiert wurde. Mit diesem Verfahren konnten von jedem klonierten Plasmid 3-10 μ g DNA mit einer Konzentration zwischen 50 und 200 ng/ μ l aufgereinigt werden.

5.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Plasmid DNA wurde zur Sequenzierung an das Labor Thiele in Kaiserslautern versandt. Die Sequenzierung wurde mit dem T7-Promoter-Primer (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') durchgeführt.

5.3 Bakterientechniken

5.3.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

(Lederberg & Cohen, 1974)

Bei der Transformation von Bakterien werden Plasmide, in welche ein ausgewähltes DNA-Fragment ligiert wurde, in die Bakterienzelle eingebracht. Bei der Teilung der Bakterienzellen wird das zu untersuchende Plasmid vervielfältigt. Anschließend kann das Plasmid aus der Bakterienkultur in großer Anzahl isoliert werden um es dann einer Sequenzanalyse zu unterziehen.

Für die Transformation mit dem pGEM-T Vektor transformationskompetente und bei -70°C gelagerte E.coli des Stammes pMOS verwandt. Zunächst wurden die Bakterien ca. 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Zu 50 μl der aufgetauten Bakteriensuspension wurde der Ligationsansatz (10 μl) hinzupipettiert und weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Bakterienzellwand durchlässig zu machen und die Aufnahme der Plasmid-DNA zu ermöglichen (Permeabilisierung) wurde ein 2 minütiger Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension sofort kurz auf Eis gestellt um die entstandenen Poren in der Bakterienwand zu schließen. Nun wurden 200 μl LB Medium ohne Antibiotikum zu der Bakteriensuspension hinzugefügt und eine einstündige Vorkultur bei 37°C auf einer Schüttelplatte durchgeführt. Anschließend wurde die Vorkultur mit einem Drigalski-Spatel auf eine, für das Blue-White Screening vorbereitete (Kap. 5.3.2), Ampicillin enthaltende Agarplatten ausplattiert. Durch den Zusatz von Ampicillin zum LB-Agar wurde eine Selektion transformierter Bakterien ermöglicht. Die beimpfte Agarplatte wurde über Nacht für 16-20 h bei 37°C bebrütet.

Für die Transformation mit dem pCR 2.1-TOPO Vektor wurden One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli von Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers transformiert und auf Agarplatten mit Ampicillin herangezogen.

5.3.2 Blue-White Screening

Das Blue White Screening ist eine Methode um Bakterienkolonien welche mit einem inserttragenden Vektor transformiert wurden von solchen zu unterscheiden, die nur einen Leervektor enthalten. Die Methode basiert auf einer enzymatischen Reaktion bei der das Substrat X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropylthiogalaktosid) durch die β -Galaktosidase

zu einem blauen Produkt umgewandelt wird. Es können nur Bakterienstämme verwandt werden denen die β -Galaktosidase fehlt. Es kommen Vektoren zum Einsatz, welche für das Enzym in Form eines lacZ-Gens kodieren und deren Klonierungsstelle innerhalb dieses Gens liegt. Ist ein Insert in den Vektor integriert, kann kein funktionelles Enzym mehr gebildet werden und die Kolonie bleibt ungefärbt. Bakterien die mit einem Vektor ohne Insert transformiert wurden bilden die β -Galaktosidase und erscheinen als blaue Kolonien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das Blue-White Screening jeweils 35 μ l X-Gal und 20 μ l IPTG auf die Agarplatten verteilt und die Platten anschließend vor der Beimpfung inkubiert bis beide Substanzen in den Agar eindiffundiert waren.

5.4 Sequenzanalyse und statistische Auswertung

5.4.1 Auswertung der HERV-W-*env* Sequenzen

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Methode basiert darauf, dass unterschiedliche provirale Loci charakteristische Sequenzunterschiede haben, welche eine Zuordnung der Transkripte zu den Loci erlauben. Die Zuordnung der klonierten HERV-W-*env* Sequenzen zu proviralen HERV-W-*env* Loci im humanen Genom wurde nach folgender Methode durchgeführt. Zunächst wurden die Chromatogramme hinsichtlich der klaren Differenzierbarkeit der Peaks der einzelnen Basen überprüft. Waren die Chromatogramme unsauber, d.h. gingen sie z.B. auf mehrere Template Sequenzen zurück so wurden sie nicht berücksichtigt ($< 0,1$ % der Sequenzen). Bei Chromatogrammen welche gegen Ende der Sequenz nur schlecht differenzierbar waren (breite, niedrige, oder sich stark überlappende Peaks) wurden die entsprechenden Sequenzen gekürzt, um eine falsche Zuordnung durch Sequenzierfehler zu vermeiden. Anschließend wurde aus den Fasta Dateien, die über die Primer hinausgehenden Sequenzanteile entfernt um falsch niedrige Trefferquoten in der BLAT-Search durch die mitsequenzierten Vektor-Abschnitte zu unterbinden. Im nächsten Schritt wurden alle Sequenzen einer „human BLAT-Search“ unterzogen (<http://genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat>). Nach dem Ergebnis wurden alle Sequenzen einer Probe in Gruppen eingeteilt:

- Sequenzen welche $\geq 99,5\%$ Übereinstimmung mit einem HERV-W-*env* Locus zeigten wurden diesem probatorisch zugeordnet
- Sequenzen mit $< 99,5\%$ Übereinstimmung wurden als zunächst unklaren Ursprungs definiert.

Anschließend wurden alle auf einen HERV-W-*env* Locus zurückgehenden Sequenzen bzw. alle als unklar definierten Sequenzen einer PBMC-Probe zusammen mit den in Frage kommenden Referenzsequenzen in einer Fasta-Datei zusammengefasst um sie in einem multiplen Alignment, darzustellen. Multiple Alignments werden angefertigt um Sequenzen parallel zueinander, je in einer Zeile fortlaufend, darzustellen und so gemeinsame Abschnitte bzw. Unterschiede sichtbar zu machen (siehe Abb. 5). Zunächst wurden die Sequenzen mittels des Computerprogramms „muscle“ align (Edgar, 2004). Dieses Alignment wurde mit Hilfe der Webseite Boxshade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) bearbeitet, so dass nur die zur in der ersten Zeile stehenden Referenzsequenz unterschiedlichen Basen im Buchstabencode aufgeführt sind („Output format: ASCII II differences“). Die gemeinsamen Abschnitte wurden dabei durch Platzhalter (···) ersetzt. Abschließend wurden alle Alignments manuell bezüglich ihrer Mutationen, d.h. der Abweichungen zu den genomischen Referenzsequenzen durchgesehen. Durch die Darstellung im multiplen Alignment konnte für jede Base, welche von der Referenzsequenz abweicht, genau überprüft werden ob sie mit einer der anderen HERV-W Sequenzen übereinstimmt. War dies bei zwei oder mehr „Mutationen“ einer Sequenz in Folge der Fall, so wurde angenommen dass die untersuchte Sequenz ab dieser Stelle auf den anderen Referenzlocus zurückgehen. (= „Rekombination“, siehe Abb. 5).

HERV-W- <i>env</i> _chrX	361	TGTAGTTTTGAGAGAACTAGTCCTTTGTAGGGGCTAGGGGTGCTATGTCCCCGGGTCAGT
HERV-W- <i>env</i> _chr15	356T.....C.....A.T.A.....
MS-II-K1	357T.....C.....A.T.A.....
MS-II-K2	361
HERV-W- <i>env</i> _chrX	421	TGGGAGATTGCTTCCTTTACTTGTGTTTTCTCTGCTGACCTTGAATCCACCCCATCA
HERV-W- <i>env</i> _chr15	416A.....G.....T.....C.....T.....
MS-II-K1	417A.....G.....T.....C.....T.....
MS-II-K2	421
HERV-W- <i>env</i> _chrX	481	GACATACTGGTATGGGTGAAGTCAACAGACAGTGGCTCCAAGTCTCCAGGACAA
HERV-W- <i>env</i> _chr15	476CA.....C.....
MS-II-K1	477C.....C.....
MS-II-K2	481

Abbildung 5: Beispiel für die Mutationsanalyse einer rekombinierten Sequenz anhand eines Multiplen Alignments (Ausschnitt der beiden Sequenzen MS-II-K1 und MS-II-K2). Die ersten beiden Zeilen geben die Sequenz der hier beteiligten Referenz-Loci im humanen Genom wieder. Ab der zweiten Zeile sind die zur Referenzsequenz in der ersten Zeile (HERV-W-*env*_chrX) synonymen Basen nur als · angegeben. Es ist zu erkennen, dass die Sequenz MS-II-K1 bis Basenpaar 426 an allen charakteristischen Stellen (gelb) mit dem Provirus auf Chromosom 15 übereinstimmt. Ab Basenpaar 437 (Thymin) zeigt sie an allen für Chromosom 15 charakteristischen Stellen jedoch eine Übereinstimmung mit dem Provirus auf Chromosom X (grün) und ist ab hier diesem zuzuordnen – es muß also im genannten Bereich (bp 426 – 437) ein Rekombinationsereignis stattgefunden haben. Außerdem ist zu erkennen, dass die Sequenz MS-II-K2 auf dem gezeigten Abschnitt ohne Rekombinationsereignis mit dem Provirus auf Chromosom X übereinstimmt.

6 Ergebnisse

6.1 Analyse der Transkriptionsaktivität verschiedener HERV-W-*env* Loci

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transkriptionsaktivität von HERV-W-*env* Loci in PBMC's von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen mittels Ausklonierung und anschließender Sequenzierung untersucht. Von den in Kapitel 3.9.1 aufgeführten vier Patienten und vier Kontrollen wurden jeweils mindestens 40 Klone hergestellt, sequenziert und nach dem in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Verfahren ausgewertet. Insgesamt wurden 332 Klone analysiert. Im Folgenden werden die dabei gewonnenen Ergebnisse dargestellt.

6.1.1 Ergebnisse der Reinheitskontrolle der cDNA

Unter Verwendung der beschriebenen Methoden (siehe Kap. 5.2) wurde aus PBMC Proben von vier Patienten und vier gesunden Kontrollen mRNA aufgereinigt. Diese wurde anschließend in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe Kap. 5.2.4). Wie in Kap. 5.2.6 beschrieben, ist die Herstellung von cDNA welche sicher frei von Verunreinigungen durch genomische DNA ist, und somit ausschließlich auf mRNA Transkripte zurückgeht, ein entscheidender Punkt um die Aussagefähigkeit der folgenden Experimente sicherzustellen. Die bei der Reversen Transkription hergestellte cDNA wurde einer PCR mit 40 Zyklen gemäß dem PCR-Programm KR 58_40 unter Verwendung des Primerpaares für das Zielgen HERV-W-*env* (siehe Kap. 3.6) unterzogen, um die darin enthaltenen HERV-W-*env* Transkripte für die folgende Klonierung zu amplifizieren. Mit Hilfe dieser PCR wurde auch überprüft, ob sich in den parallel prozessierten Negativkontrollen (ohne Zugabe von Reverser Transkriptase) tatsächlich keine HERV-W-*env* Transkripte nachweisen ließen. Abbildung 6 zeigt exemplarisch ein Agarosegel einer solchen Kontroll-PCR für zwei der hergestellten cDNA Proben. Auch alle anderen hergestellten cDNA Proben wurden einer identischen Kontrolle unterzogen. Alle später zur Klonierung und Sequenzierung verwandten cDNA Proben waren nach diesen Kriterien frei von Verunreinigungen mit genomischer DNA.

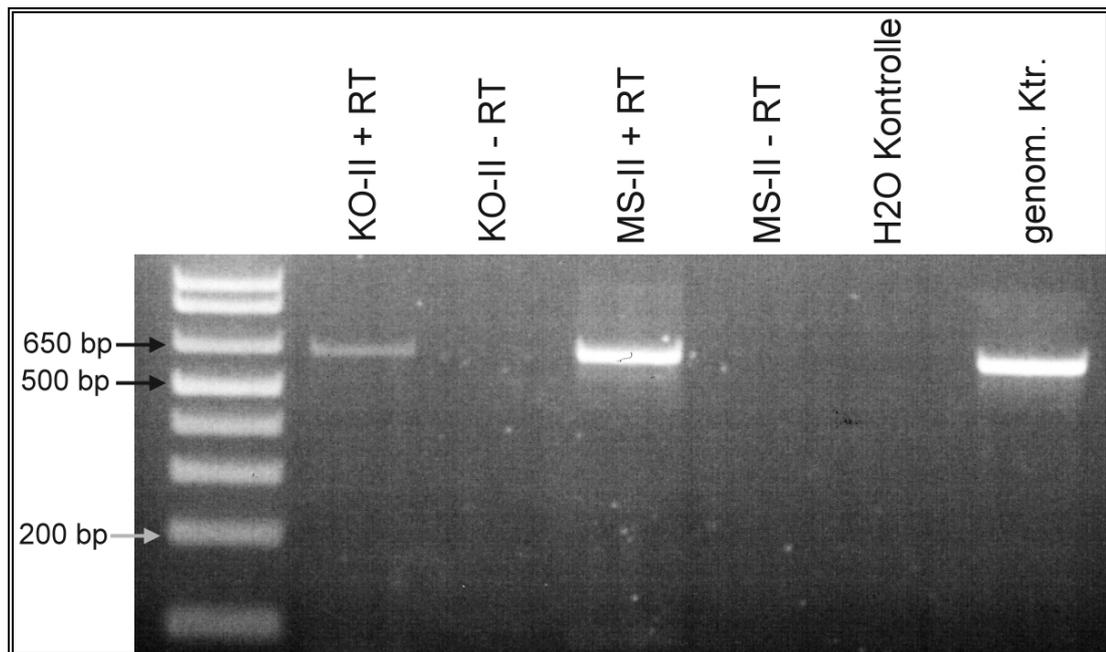


Abbildung 6: Agarosegel einer Kontrolle – PCR zum Ausschluss von Verunreinigungen bei der cDNA Herstellung. Nach DNase Verdau und Reverser Transkription der mRNA wurden sowohl die plus-RT als auch die minus-RT Probe einer PCR (Primer: MS/HERV-U und Nell-env-R) mit 40 Zyklen zur Kontrolle der cDNA Herstellung unterzogen. Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Zu sehen ist, dass in beiden Proben zu welchen Reverse Transkriptase hinzugegeben wurde (KO-II + RT und MS-II + RT) ein PCR-Produkt generiert werden konnte (Banden bei 641 bp) während bei den beiden Kontrollenproben ohne Zugabe von Reverser Transkriptase keine Banden zu erkennen sind. Die als negativ zu bewertende Wasserkontrolle (H2O Kontrolle) und die positive genomische Kontrolle (genom. Ktr.) bestätigen die korrekte Durchführung der PCR.

6.1.2 Transkribierte HERV-W-*env* Loci in humanen PBMC's

Für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Transkriptionsaktivität von HERV-W-*env* Loci wurden die Primer MS/HERV-U und Nell-env-R verwendet um aus der hergestellten cDNA die entsprechenden cDNA Fragmente zu amplifizieren. Dieses Primerpaar erfasst laut Blat-PCR neun verschiedene HERV-W-*env* Loci im humanen Genom. Bei der Charakterisierung der amplifizierten HERV-W-*env* Transkripte durch Klonierung und Sequenzierung von 332 Klonen mit ≥ 40 Klonen je Patient und Kontrolle stellte sich heraus, dass von den neun theoretisch erfassten Loci nur fünf auch *in-vivo* transkriptionsaktiv waren. Bei den transkriptionsaktiven Loci handelte es sich um HERV-W-*env* Proviren auf Chromosom 6q21, Xq22.3, 7q21.2, 17q12 und 5q11.2. Die ebenfalls von dem Primerpaar erfassten Genloci auf Chromosom 11p14.3, 12q13.13, 1p32.3 und 5q21.3 scheinen in PBMC's nicht transkriptionsaktiv zu sein und wurden bei keinem der sequenzierten Klone nachgewiesen. Allerdings

konnten Transkripte von zwei weiteren Loci nachgewiesen werden, welche aufgrund eines Mismatch des Primers am 5' Ende nicht zu erwarten gewesen wären. Eines dieser beiden unerwarteten Transkripte, ein auf Chromosom 15q21.3 gelegenes HERV-W-*env* Provirus, machte mit 39,7% trotz der ungünstigeren Bedingungen für eine Amplifikation während der PCR insgesamt den größten Anteil der sequenzierten Klone aus (siehe Tab. 14 sowie Abb. 10 und 11). Die zweite nachgewiesene Sequenz, welche auf genomischer Ebene am 5' Ende nicht mit dem eingesetzten Forward Primer übereinstimmt, ist ein auf Chromosom 14q21.3 gelegenes HERV-W-*env* Provirus. Dieses wurde insgesamt viermal beobachtet, einmal alleine und dreimal in Kombination mit anderen Proviren als Bestandteil rekombinierter Sequenzen (siehe Kap. 6.1.5). Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der verwandten Primer sowie der theoretisch erfassten als auch tatsächlich nachgewiesenen Loci.

6.1.3 Zuordnung der sequenzierten Klone – Bedeutung von Rekombinationen

Nach abgeschlossener Sequenzierung von ≥ 40 zufällig ausgewählten Klonen je Probe erfolgte die Zuordnung der erhaltenen Sequenzen zu den in Frage kommenden HERV-W-*env* Loci im Genom. Dabei wurde nach dem in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Zunächst erfolgte die vorläufige Zuordnung der Sequenzen zu einem Provirus mittels einer Blat-Search (<http://genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat>). Anschließend wurde eine manuelle Analyse aller abweichenden Nucleotide innerhalb der Sequenz mit Hilfe eines multiplen Alignments durchgeführt.

Bei der „human BLAT-Search“ aller sequenzierten 332 Klone zeigte sich, dass fünf der neun potentiell von unserem Primerpaar erfassten Proviren tatsächlich transkriptionsaktiv sind. Außerdem wurden Transkripte von zwei weiteren, primär nicht vom Primerpaar erfassten Proviren nachgewiesen (siehe Tab. 12). Insgesamt wurden Transkripte sieben verschiedener proviraler Loci nachgewiesen. Bei Erstellung der multiplen Alignments, für die detaillierte Analyse der abweichenden Nucleotide, wurden diese sieben auftretenden proviralen Loci als Referenzproviren eingeschlossen.

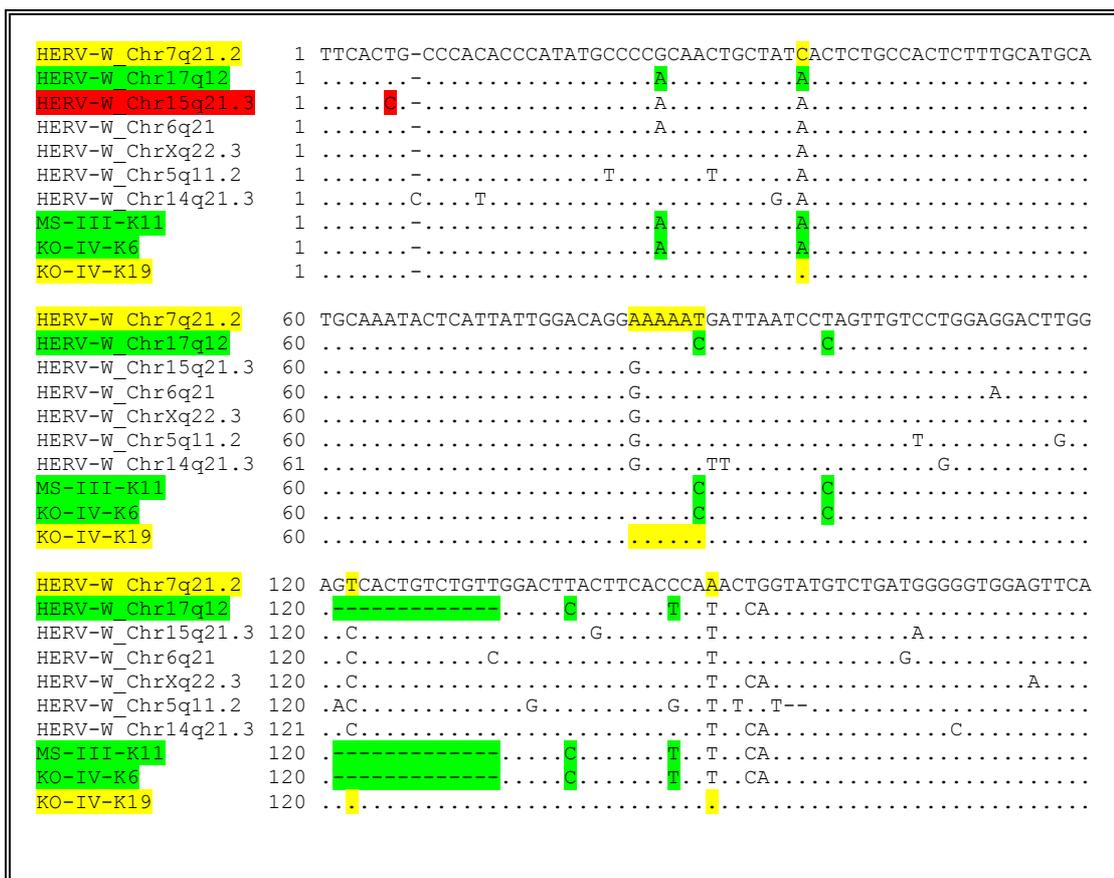
Im Zuge der manuellen Analyse der Klone (siehe Kap. 5.4.1) wurden Sequenzen angetroffen, welche auf zwei oder mehr Referenz-Proviren zurückgehen. Diese Tatsache lässt sich durch Annahme von Rekombinationsereignissen erklären, wie auch von Flockerzi et al. gezeigt werden konnte (Flockerzi et al., 2007). Solche *ex-vivo* Rekombinationen von Sequen-

HERV-W Locus	Forward: MS/Herv-U (5' – 3')	Revers: Nell-env-R (5' – 3')	Länge, Amplicon	Provirus transkribiert
Primersequenzen	TTC ACT GCC CAC ACC CAT	GAG GTA CCA CAG ACA AAA AAT ATT CCT		
Chro X 106183197 – 106183837	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- --- --- ---	641 bp	Ja
Chro 7 91936808 – 91937448	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- --- --- ---	641 bp	Ja
Chro 17 32765922 – 32766546	--- --- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- --- --- ---	625 bp	Ja
Chro 6 106788519 – 106789159	--- --- --- --- --- ---	A-- --- --- --- --- --- --- ---	641 bp	Ja
Chro 11 22290985 – 22291623	--- --- --- --- --- ---	--A --- --- --- --- --- --- ---	639 bp	Nein
Chro 12 49584167 – 49584808	--- --- --- --- --- ---	--A --- --- --- --- --- --- ---	642 bp	Nein
Chro 1 55151228 – 55151868	--- --- --- --- --- ---	--A --- --- --- --- --- --- ---	641 bp	Nein
Chro 5 107939347 – 107939986	--- --- --- --- --- ---	--- --- -T- --- --- --- --- ---	640 bp	Nein
Chro 5 56852791 – 56853425	--- --- --- --- --- ---	--- --- -T- --- --- --- --- ---	635 bp	Ja
* Chro 15 53385554 – 53386189	--- --C --- --- --- ---	--- --- --- --- --- --- --- ---	636 bp	Ja
* Chro 14 44559628 – 44559996	--- --- --- -CA TA- -CA	--- --- --- --- --- --- --- ---	632 bp	Ja

Tabelle 12: Übersicht der bei der Transkriptionsmusteranalyse von den Primern theoretisch erfassten als auch tatsächlich nachgewiesenen HERV-W-*env* Loci. In der ersten Zeile sind die Sequenzen der Oligonukleotide aufgezeichnet, welche zur Amplifikation der, in der hergestellten cDNA vorhandenen HERV-W-*env* Transkripte, verwandt wurden. Als Forward-Primer diente MS/Herv-U, als Revers Primer Nell-env-R, beide hier in 5' – 3' Richtung dargestellt. In den folgenden Zeilen sind die gemäß Blat – PCR zu erwartenden PCR Produkte mit ihrer genauen Lokalisation im Genom notiert. Zum Primer komplementäre Nukleotide sind durch „-“ gekennzeichnet, zum Primer nicht komplementäre Nukleotide sind im Buchstabencode angegeben. Die beiden mit Sternchen (*) markierten Loci zeigen mehr oder minder starke Abweichungen am 5' Ende der Sequenz im Bindungsbereich des forward-Primers, wurden allerdings im Zuge der Sequenzierung der hergestellten Klone ebenfalls nachgewiesen. Das Provirus auf Chromosom 15q21.3 stellte mit 39,7% der zugeordneten Sequenzen den insgesamt größten Gesamtanteil während das auf Chromosom 14 gelegene Provirus in der hier angegebenen Länge nur einmal nachgewiesen wurde, Fragmente dieses Provirus wurden dreimal als Bestandteil rekombinierter Sequenzen nachgewiesen. Außerdem ist in den letzten beiden Spalten die Länge der Amplicons angegeben und notiert welche der HERV-W-*env* Loci durch Sequenzierungen nachgewiesen wurden, und folglich *in-vivo* transkribiert werden.

zen können während der Reversen Transkription oder auch im Rahmen der PCR auftreten (siehe Kap. 7.2). Dabei kommt es nach begonnener Synthese des DNA Stranges zu einem Sprung der Reversen Transkriptase bzw. der Taq-Polymerase auf einen anderen Matrizenstrang der von einem zweiten, anderen Provirus herrührt. Das Enzym löst sich von seiner ursprünglichen Matrize und fährt mit der Synthese auf der neuen mRNA bzw. neuen Matrizen DNA fort. Dadurch ist der synthetisierte DNA-Strang eine Chimäre aus zwei oder mehr proviralen Sequenzen, je nachdem wie oft es zu einem solchen „Sprung“ gekommen ist. Auf diese Art und Weise ließen sich auch alle zunächst als unklar definierten Sequenzen eindeutig zu zwei oder mehr Referenzsequenzen zuordnen. In der statistischen Auswertung (siehe Kap. 6.1.5) wurden die rekombinierten Sequenzen mehrfach (d.h. bei Beteiligung zweier HERV-W-*env* Loci als zwei Sequenzen) gewertet, da für jeden Abschnitt ursprünglich eine mRNA als Matrize vorgelegen haben muss.

Abbildung 7 erläutert das Verfahren der Zuordnung von Sequenzen mittels multipler Alignments exemplarisch für 3 der 332 Klone.



HERV-W Chr7q21.2	180	AGATCAGGCAAGAGAAAAACATGTAAAAGAAAGTAATCTCCCAACTCACCCGGGTACATGG
HERV-W Chr17q12	167C.....CA.....G.....G.....T.....A.
HERV-W Chr15q21.3	180C.....G.....G.....T.....A.....A.
HERV-W Chr6q21	180G.....A.....G.....C.....G.....G.....A.
HERV-W ChrXq22.3	180G.....A.....G.....C.....G.....G.....A.
HERV-W Chr5q11.2	178C.....G.....G.....G.....G.....A.
HERV-W Chr14q21.3	181G.....CA.....G.....G.....G.....A.
MS-III-K11	167C.....CA.....G.....G.....T.....A.
KO-IV-K6	167C.....CA.....G.....G.....T.....A.
KO-IV-K19	180G.....CA.....G.....G.....T.....A.
HERV-W Chr7q21.2	240	CACCTCTAGCCCCTACAAAGGACTAGATCTCTCAAACCTACATGAAACCCCTCCGTACCCA
HERV-W Chr17q12	227C.....G.....G.....G.....T.....A.....A.
HERV-W Chr15q21.3	240C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr6q21	240C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W ChrXq22.3	240C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr5q11.2	238C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr14q21.3	241C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
MS-III-K11	227C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K6	227C.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K19	240G.....CA.....G.....G.....T.....A.....A.
HERV-W Chr7q21.2	300	TACTCGCCTGGTAAGCCTATTTAATACCACCCTCACTGGGCTCCATGAGGCTCCGCCCA
HERV-W Chr17q12	287G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr15q21.3	300G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr6q21	300G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W ChrXq22.3	300G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr5q11.2	298G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr14q21.3	301G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
MS-III-K11	287G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K6	287G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K19	300G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr7q21.2	360	AAACCCTACTAACTGTTGGATAAGCCTCCCCTGAACCTTCAGGCCATATGTTCAATCCC
HERV-W Chr17q12	347G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr15q21.3	360G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr6q21	360G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W ChrXq22.3	360G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr5q11.2	358G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr14q21.3	361G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
MS-III-K11	347G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K6	347G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K19	360G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr7q21.2	420	TGTACCTGAACAATGGAACAACCTTCAGCACAGAAATAAACACCACCTTCCGTTTTAGTAGG
HERV-W Chr17q12	407G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr15q21.3	420G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr6q21	420G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W ChrXq22.3	420G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr5q11.2	418G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr14q21.3	421G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
MS-III-K11	407G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K6	407G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K19	420G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr7q21.2	480	ACCTCTGTGTTCCAATCTGGAAATAACCCATACCTCAAACCTCACCTGTGTAAAATTTAG
HERV-W Chr17q12	467G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr15q21.3	476G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr6q21	480G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W ChrXq22.3	480G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr5q11.2	474G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
HERV-W Chr14q21.3	481G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
MS-III-K11	463G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K6	467G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.
KO-IV-K19	480G.....G.....G.....T.....A.....A.....A.

HERV-W_Chr7q21.2	540	CAATACTACATACACAACCAACTCCCAATGCATCAGGTGGGTAACCTCCACACAAAAT
HERV-W_Chr17q12	524T.G.....G...
HERV-W_Chr15q21.3	536G.T.G.....G...
HERV-W_Chr6q21	540GT.G.....G...
HERV-W_ChrXq22.3	540T.G.....G.....A.....G...
HERV-W_Chr5q11.2	534T.G.....T.....G...
HERV-W_Chr14q21.3	541T.G.....G.....A.....G...
MS-III-K11	523G.T.G.....G.....G...
KO-IV-K6	527G.....G.....G...
KO-IV-K19	540G.....G.....G...
HERV-W_Chr7q21.2	600	AGTCTGCCTACCCTCAGGAATATTTTTTGTCTGTGGTACCTC
HERV-W_Chr17q12	584G.....G.....G...
HERV-W_Chr15q21.3	595G.....G.....G...
HERV-W_Chr6q21	600G.....G.....G...
HERV-W_ChrXq22.3	600G.....G.....G...
HERV-W_Chr5q11.2	594G.....G.....G.....A.....G...
HERV-W_Chr14q21.3	601G.....G.....G.....A.....G...
MS-III-K11	582G.....G.....G.....G.....G...
KO-IV-K6	587G.....G.....G.....G.....G...
KO-IV-K19	600G.....G.....G.....G.....G...

Abbildung 7: Multiples Alignment der Klonsequenzen MS-III-K11, KO-IV-K6 und KO-IV-K19 mit sieben in Frage kommenden Referenzsequenzen (= die sieben im Verlauf dieser Arbeit aufgetretenen HERV-W-*env* Loci) Der Klon MS-III-K11 stammt von einem Patienten, die anderen beiden Klone (KO-IV-K6 und KO-IV-K19) von einer Kontrolle. Bei der durchgeführten Blat-Search wurde MS-III-K11 mit einer Übereinstimmung von 97,5 % dem Locus auf Chr. 17q12 zugeordnet, KO-IV-K6 wurde ebenfalls mit 96,5 % Übereinstimmung Chr. 17q12 zugeordnet, während der Klon KO-IV-K19 eine 100%ige Übereinstimmung dem HERV-W-*env* Locus auf Chr. 7q21.2 zeigte. Hier wird bereits ersichtlich, dass die Fehlerquote von 2,5 % bzw. 3,5 % der beiden erstgenannten Klone nicht allein auf Taq-Fehler bei der Amplifikation zurückzuführen sein kann. In diesem multiplen Alignment dient die Sequenz der HERV-W Kopie auf Chr. 7q21.2 als Referenz (erste Zeile). Bei allen anderen Sequenzen sind nur die Unterschiede zu dieser Referenzsequenz im Buchstabencode aufgeführt. Mit der Referenzsequenz identische Basen werden durch Punkte gekennzeichnet. Beim Betrachten der Sequenz KO-IV-K19 fällt auf, dass sie an allen für Chr. 7q21.2 charakteristischen Stellen (gelb markiert), wie z.B. bei bp 38, mit dieser Sequenz übereinstimmt (d.h. zu 100%) und so diesem Ursprung zugeordnet werden kann. Betrachtet man die Sequenz MS-III-K11, so bemerkt man, dass sie von bp 1 bis einschließlich bp 234 (Guanin) an allen charakteristischen Stellen (grün markiert) mit dem HERV-W Klon auf Chr. 17q12 übereinstimmt, was auch für KO-IV-K6 gilt. Bei bp 280 weisen beide Sequenzen jedoch statt Adenin, wie der Locus auf Chr. 17q12, ein Guanin auf (rot markiert), welches an dieser Stelle nur bei den Loci auf Chromosom 7q21.2, 15q21.3 und Xq22.3 zu finden ist. Das Vorhandensein von Adenin bei bp 253 (ebenfalls rot markiert) spricht gegen die Herkunft von ChrXq22.3, das Thymin bei bp 327 sowie 329 (rot markiert) belegt eindeutig die Herkunft beider Klone von Chr. 15q21.3 in diesem Bereich. Das Rekombinationsereignis muss folglich zwischen bp 234 und bp 280 stattgefunden haben. Der Klon MS-III-K11 weist ab bp 327 an allen für den Locus auf Chr. 15q21.3 charakteristischen Stellen (rot) identische Basen auf. Der Klon KO-IV-K6 stimmt jedoch schon bei bp 368 nicht mehr mit der Sequenz auf Chr. 15q21.3 überein. Zu erwarten wäre an dieser Stelle ein Guanin, zu finden ist jedoch ein Adenin, welches in dieser Position nur bei der HERV-W-*env* Kopie auf Chr. 7q21.2 zu finden ist (gelb markiert) Auch im weiteren Verlauf zeigt KO-IV-K6 an allen für Chr. 7q21.2 charakteristischen Stellen eine mit dieser HERV-W-*env* Kopie identische Sequenz und ist damit im letzten Teilstück unzweifelhaft auf diesen Gen-Locus zurückzuführen. Das zweite Rekombinationsereignis muss zwischen bp 329 und bp 368 stattgefunden haben. Mit dem hier exemplarisch gezeigten Alignment konnten somit alle 24 bzw. 18 Mutationen bei den Klonen MS-III-K11 bzw. KO-IV-K6 gegenüber der mutmaßlichen Ursprungssequenz auf Chr. 17q12 durch Rekombinationsereignisse eindeutig erklärt werden.

6.1.4 Auswirkung der Annahme von Rekombinationen

Wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, war das Kriterium für die Annahme eines Rekombinationsereignisses, dass innerhalb einer Sequenz mindestens zwei Nucleotide in Folge vom Referenzvirus abweichen und sich besser durch Herkunft von einem anderen Provirus erklären ließen. Nach Durchsicht und Zuordnung aller Sequenzen stellten sich 99 von 332 sequenzierten Klonen als rekombiniert heraus, was einem Anteil von 29,82 % aller Klone entspricht. Bei 66 der rekombinierten Klone waren nur zwei *HERV-W-env* Genloci beteiligt, bei 27 Klonen war es zu zwei Rekombinationsereignissen gekommen, drei Klone wiesen drei Rekombinationsstellen auf und bei drei Klonen konnten sogar vier Rekombinationen nachgewiesen werden. Tabelle 13 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der rekombinierten Sequenzen und der jeweils daran beteiligten *HERV-W-env* Loci. In der statistischen Auswertung (siehe Kap. 6.1.5) wurden die rekombinierten Sequenzen mehrfach gewertet, d.h. bei Beteiligung zweier *HERV-W-env* Loci als zwei Klone, da für jeden Abschnitt der rekombinierten Sequenz ursprünglich einmal eine vom betreffenden Gen ausgehende mRNA als Matrize vorgelegen haben muss. Dadurch stieg die Gesamtzahl der in der Auswertung berücksichtigten Sequenzen von 332 auf 471. Bezogen auf alle analysierten Sequenzen konnte die Anzahl

Anzahl Rekombinationsereignisse	Anzahl beteiligte <i>HERV-W-env</i> Loci	Anzahl Sequenzen	Gesamtanzahl gewertete Klone
0	1	233	233
1	2	66	132
2	2	11	33
2	3	16	48
3	2	0	0
3	3	2	6
3	4	1	4
4	5	3	15
Gesamtzahl		332	471

Tabelle 13: Übersicht über die Anzahl rekombinierter und nicht-rekombinierter Sequenzen, die Zahl der jeweils daran beteiligten Herkunftsloci sowie die Anzahl der für die Auswertung berücksichtigten Klone. So wurden z.B. 16 Klone sequenziert bei denen es zu zwei Rekombinationsereignissen mit jeweils drei verschiedenen daran beteiligten Ursprungsloci gekommen war (siehe Zeile 4). Ein Beispiel dafür wäre der Klon KO-IV-K6 aus Abbildung 7 mit den beteiligten *HERV-W-env* Loci auf Chromosom 17q12, 15q21.3 und 7q21.2. In die Auswertung gingen diese Sequenzen jeweils wie 3 getrennte Klone ein, was einer Anzahl von 48 gewerteten Klonen entspricht (letzte Spalte).

der nicht erklärbaren Mutationen, bzw. der nicht mit dem Herkunftslocus übereinstimmenden Basen, durch die Annahme von Rekombinationen in Verbindung mit der manuellen Auswertung von 1224 auf 324 reduziert werden (siehe Abb. 9). Die durchschnittliche Anzahl nicht mit dem Herkunftslocus übereinstimmender Nukleotide sank damit von 3,69 auf 0,98 pro Sequenz. Eine weitere Reduktion der Mutationen durch Aufdecken weiterer

HERV-W_Chr6q21	1	AAGGTACCACAGACAAAAAATATTCCTGAGGGTAGGCAGACTATTCGTGTGGGAGGAGTT	
HERV-W_ChrXq22.3	1	G.....T...	
HERV-W_Chr15q21.3	1	G.....-..G.....	
HERV-W_Chr7q21.2	1	G.....T.....	
HERV-W_Chr17q12	1	G.....	
HERV-W_Chr5q11.2	1	G.....T.....	
HERV-W_Chr14q21.3	1	G.....T.....	
HERV-W_Chr11p14.3	1	G.A.....T.....	
HERV-W_Chr12q13.13	1	G.A.....A.....	
HERV-W_Chr1p32.3	1	G.A.....T.....C.....A	
HERV-W_Chr5q21.3	1	G.....T.....A.....	
MS-IV-K7	1	G.....	
HERV-W_Chr6q21	61	-----	590
HERV-W_ChrXq22.3	61		590
HERV-W_Chr15q21.3	60		585
HERV-W_Chr7q21.2	61		590
HERV-W_Chr17q12	61		574
HERV-W_Chr5q11.2	61		584
HERV-W_Chr14q21.3	61		590
HERV-W_Chr11p14.3	61		588
HERV-W_Chr12q13.13	61		591
HERV-W_Chr1p32.3	61		590
HERV-W_Chr5q21.3	61		589
MS-IV-K7	61	590
HERV-W_Chr6q21	591	AAGAGTGGCAGAGTTATAGCAGTTGTGGGCAT	A.TGGGTGT-GGGCAGTGAA
HERV-W_ChrXq22.3	591	C
HERV-W_Chr15q21.3	586-..G.....	
HERV-W_Chr7q21.2	591G.....	C
HERV-W_Chr17q12	575-.....	
HERV-W_Chr5q11.2	585A...C...A.....	
HERV-W_Chr14q21.3	591C.....	C
HERV-W_Chr11p14.3	589C...T.....	
HERV-W_Chr12q13.13	592-.....A..	
HERV-W_Chr1p32.3	591C...A.....	
HERV-W_Chr5q21.3	590A.....CA.....	
MS-IV-K7	591	C

Abbildung 8: Beispiel einer nicht klar zuzuordnenden Mutation des Klonen MS-IV-K7. Multiples Alignment mit allen in Frage kommenden Referenzsequenzen. Die Blast-Suche ergab eine Übereinstimmung von 99,9% mit dem HERV-W-*env* Locus auf Chr. 6q21 was einer Abweichung von einem Nukleotid entspricht. Der Bereich zwischen bp61 und bp 590 ist aufgrund der Länge nicht wiedergegeben. Als einzige Mutation findet sich bei bp 617 (**grün**) Cytosin statt Thymin (noch außerhalb des Primerbindungsbereichs = **rot**). Wie in der Abbildung zu sehen ist, könnte diese Mutation unter Annahme eines Rekombinationsereignisses mit Transkripten der Proviren auf Chromosom Xq22.3, 7q21.2 und Chr14q21.3 erklärt werden, da all diese hier ebenfalls ein Cytosin besitzen (**gelb**) und keine weiteres abweichendes Nukleotid vor Beginn der Primerbindungsstelle folgt. Daher lässt sich nicht eindeutig entscheiden, welches HERV-W-*env* Gen zur Rekombination beigetragen hat, weshalb die Sequenz mit einer verbleibender Mutation Chr. 6q21 zugeordnet wurde.

Rekombinationen war nicht möglich, da bei nur einem Nukleotidaustausch meist keine eindeutige Zuordnung zu einem Herkunftslocus zu erreichen war. Dies beruht auf der Tatsache, dass oft mehrere der in Frage kommenden HERV-W-*env* Loci an einer bestimmten Stelle eine identische Mutation aufweisen. In diesem Falle wurden die betreffenden Sequenzen mit nur einem (bzw. wenigen) abweichenden Basenpaaren als nicht rekombiniert, und auf einen HERV-W-*env* Genlocus zurückgehend, angesehen. Abbildung 8 zeigt beispielhaft das multiple Alignment einer solchen nicht eindeutig einzuordnenden Mutation. Das Diagramm in Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der Mismatches pro Sequenz vor und nach Analyse bezüglich möglicher Rekombinationsereignisse.

Deutlich ist eine Häufung von Sequenzen mit >10 Nukleotiden Abweichung vom mutmaßlichen Herkunftslocus vor der Annahme von Rekombinationen zu erkennen (blaue Säulen). Nach der Auswertung ließen sich alle Sequenzen mit > 8 Basenpaaren Abweichung zum, mit Hilfe der Blast-Search ermittelten, besten Treffer durch Rekombinationen zwischen den Transkripten erklären. Nur noch zwei Sequenzen wiesen jetzt eine Abweichung von mehr als 5 Nukleotiden zu den ermittelten proviralen Loci auf.

Unter der Annahme, dass häufige Sequenzen oft und seltene Transkripte entsprechend weniger häufig an Rekombinationen beteiligt sind, müsste sich für die an den rekombinierten Sequenzen beteiligten Herkunftsloci eine ähnliche Verteilung ergeben, wie für die an den nicht rekombinanten Sequenzen beteiligten HERV-W-*env* Loci. Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, bestätigte sich diese Annahme bei Auswertung der als rekombiniert identifizierten Klone. Der Genlocus auf Chromosom 15q21.3 trat 76 mal in einer rekombinierten Sequenz auf, Chr. 6q21 65 mal, Chr. Xq22.3 45 mal, Chr.7q21.2 33 mal, Chr. 17q12 15 mal, Chr14q21.3 drei mal und Chr5q11.2 lediglich einmal.

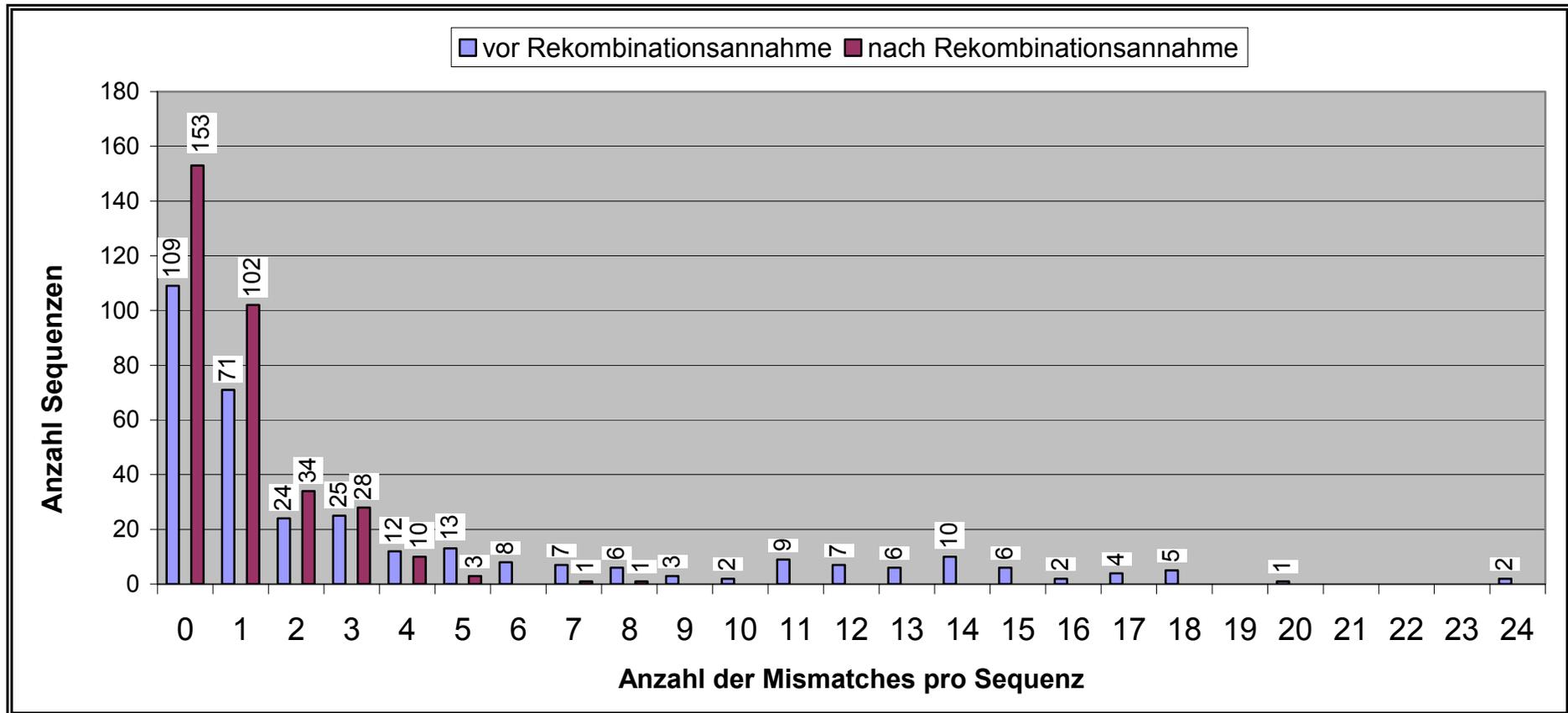


Abbildung 9: Übersicht über die Häufigkeit von Sequenzen mit einer bestimmten Anzahl an Nukleotidabweichungen zur Referenzsequenz vor und nach Annahme von Rekombinationsereignissen. Die blauen Balken (vor Rekombinationsannahme) geben die Anzahl an Nukleotidabweichungen der sequenzierten Klone zum jeweils per Blast – Search ermittelten besten Treffer wieder. Nach erfolgter Auswertung der Sequenzen bezüglich möglicher Rekombinationsereignisse, wurden erneut die noch verbleibenden, von den ermittelten Herkunftsloci abweichenden Basen gezählt. Zu erkennen ist, dass nach Berücksichtigung von Rekombinationen, keine der Sequenzen mehr als acht Nukleotide Abweichung zu ihren Ursprungsloci zeigt. Nur zwei Sequenzen wiesen noch mehr als fünf Basenpaare Abweichung zu den Ursprungsloci auf. Die Anzahl an Sequenzen ohne zu ihren Herkunftsloci abweichende Nukleotide konnte um 44 auf 153 Sequenzen erhöht werden und auch die Anzahl der Sequenzen mit nur einer nicht erklärbaren, von ihren Herkunftsloci abweichenden Mutation stieg um 31 auf 102 Sequenzen.

HERV-W- <i>env</i> Locus	Anteil an nicht re-kombinierten Klonen	Anteil an rekombinierten Klonen	Anteil an Gesamtklonen
15q21.3	47,64	31,93	39,7
6q21	27,48	27,31	28,03
Xq22.3	9,87	18,91	13,8
7q21.2	7,3	13,87	10,62
17q12	6,87	6,3	6,58
14q21.3	0,43	1,26	0,85
5q11.2	0,43	0,42	0,42

Tabelle 14: Übersicht über den prozentualen Anteil der transkriptionsaktiven HERV-W-*env* Loci im humanen Genom an den nicht – rekombinierten und rekombinierten Klonen sowie den Anteil an den gesamten gewerteten Klonen. Aus der Tabelle geht hervor, dass sich die Rangfolge der Häufigkeit der einzelnen Proviren durch die Berücksichtigung der rekombinanten Sequenzen nicht verschiebt. Außerdem wurden bei Analyse der rekombinierten Sequenzen keine neuen proviralen Loci angetroffen, welche nicht bereits aus der Analyse der nicht rekombinierten Sequenzen bekannt waren.

6.1.5 Ergebnisse der HERV-W-*env* Transkriptionsmusteranalyse bei Multiple Sklerose Patienten und gesunden Kontrollen

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchung bezüglich der Transkriptionsaktivität und des Transkriptionsmusters der ausgewählten Gruppe von HERV-W-*env* Loci (siehe Kap. 6.1.2) in PBMC's von vier Multiple Sklerose Patienten und vier gesunden Kontrollen dargestellt werden. Von jeder Probe wurden ≥ 40 Klone sequenziert und ihnen nach oben beschriebenen Verfahren (Kap. 5.4.1 und Kap. 6.1.3) die entsprechenden proviralen Herkunftsloci zugeordnet. So konnte ermittelt werden, ob und welche HERV-W-*env* Loci mRNA Transkripte herstellen und wie häufig die einzelnen Transkripte auftreten.

Die Untersuchung bezüglich der relativen Häufigkeit der Transkripte zueinander beruht auf der Überlegung, dass ein zahlenmäßig überwiegendes mRNA's Transkript zu entsprechend mehr cDNA mit der entsprechenden Sequenz führt, als eine seltene mRNA. Diese DNA wird dann in dem anschließenden PCR Schritt mit entsprechend größerer Wahrscheinlichkeit amplifiziert, was demnach zu einer, den mRNA Transkripten entsprechenden Verteilung der

PCR-Produkte führt. Dadurch wird die auf das häufigere mRNA Transkript zurückgehende, amplifizierte DNA bei der Ligation auch häufiger in Plasmide inkloniert. Bei der zufälligen Auswahl der Klone zur analytischen Plasmidaufarbeitung und anschließenden Sequenzierung spiegelt somit die relative Häufigkeit der auftretenden Sequenzen die relativen Mengenverhältnisse der ursprünglichen mRNA's wieder.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Verteilung der einzelnen Loci bei allen untersuchten Proben. Auffällig ist eine relativ starke Schwankungsbreite der Anteile der einzelnen Loci die z.B. für das Provirus von Chromosom 15q21.3 bei den Kontrollen von 20 bis ca 59% und bei den Patienten von ca 17 bis 69% reicht. Auch die anderen Loci weisen eine ähnlich starke Streuung auf. Demgegenüber machen die Loci auf Chromosom 14q21.3 und 5q11.2 bei allen Proben einen Anteil von unter 5% aus und sind somit konstant selten zu finden.

Fasst man die Klone aller Patienten und aller Kontrollen zusammen, so lässt sich erkennen dass trotz der hohen Schwankungsbreite insgesamt keine wesentlichen Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen proviralen Transkripte zwischen den beiden Gruppen bestehen. Abbildung 12 zeigt einen Whisker-Boxplot zum Vergleich der beiden Kollektive. Insgesamt wurden 332 Klone sequenziert, 170 von Kontroll- und 162 von Patientenproben. Nach der in Kap. 6.1.4 beschriebenen Berücksichtigung rekombinierter Sequenzen ergab sich daraus eine Gesamtzahl von 471 gewerteten Transkripten mit 253 von Kontrollen und 218 von Patienten stammenden Sequenzen bzw. Sequenzteilen. Ausgehend von einer Gesamtzahl von 471 analysierten Transkripten ergibt sich nur für das von Chromosom 7q21.2 stammende Provirus ein statistisch signifikant niedrigere Klonierungsfrequenz mit 17 Sequenzen bei den Patienten im Vergleich zu 33 Sequenzen bei den Kontrollen ($p = 0,0443$ mit Fishers exact test). Aufgrund der relativ kleinen Fallzahl ist diesem Befund allerdings sehr wahrscheinlich keine biologische Relevanz beizumessen. Bei allen anderen proviralen Loci unterscheidet sich die Transkriptionsaktivität zwischen Patienten und Kontrollkollektiv nicht signifikant und die gefundenen Unterschiede liegen im Rahmen der Streubreite der Methode.

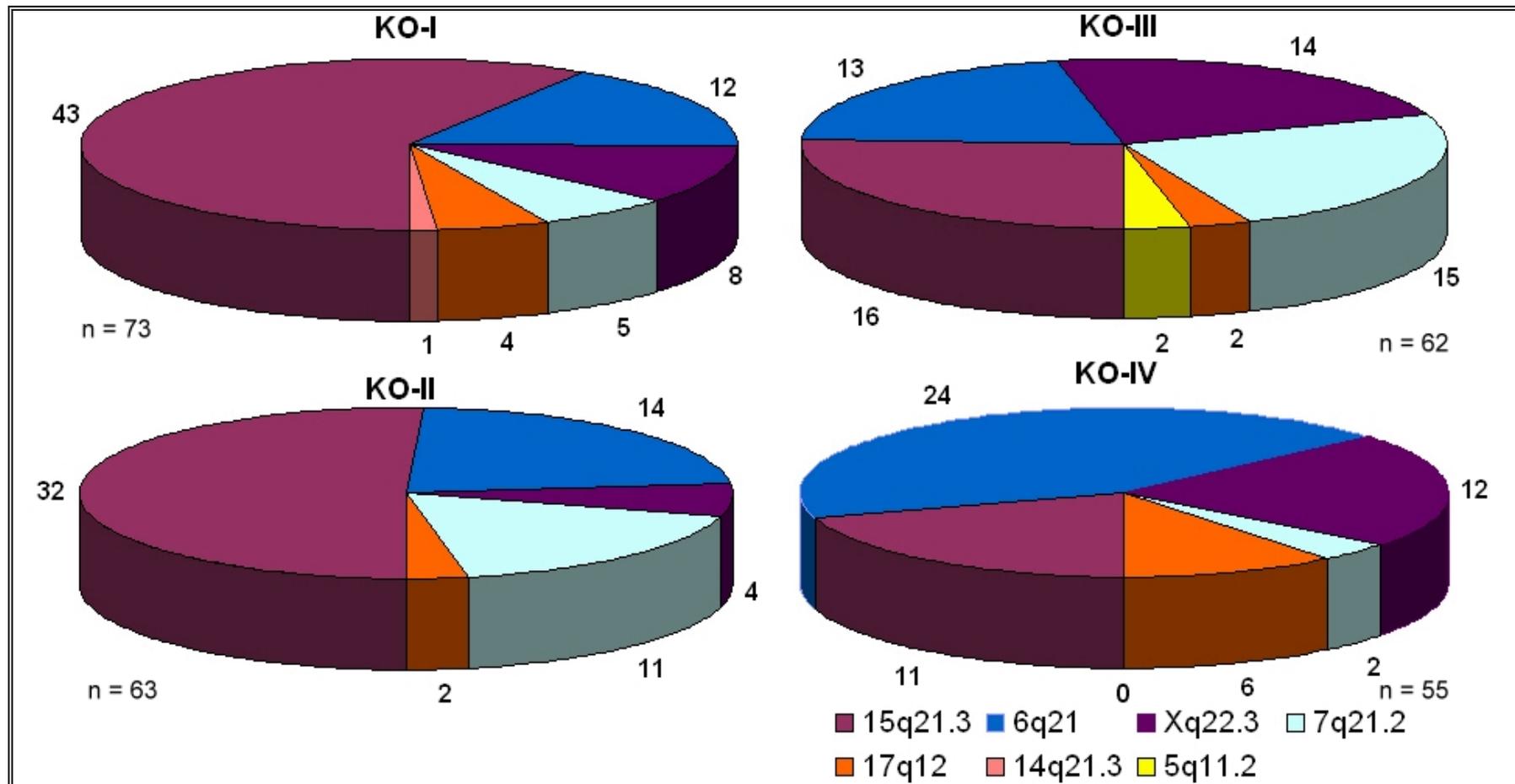


Abbildung 10: Klonierungsfrequenz der einzelnen HERV-W-*env* Loci bei vier gesunden Kontrollen. Alle Zahlenangaben sind absolut, d.h. bei KO-I wurde z.B. 43 mal das Provirus auf Chromosom 15q21.3 als Herkunftslocus nachgewiesen. Der relative Anteil der einzelnen Proviren an den gesamten Klonen einer Kontrolle ist anhand der Größe der Tortenstücke ersichtlich. Die schwankende Gesamtzahl an Klonen zwischen den gesunden Kontrolle ergibt sich durch die unterschiedliche Anzahl an rekombinanten Sequenzen mit unterschiedlicher Anzahl an beteiligten Loci.

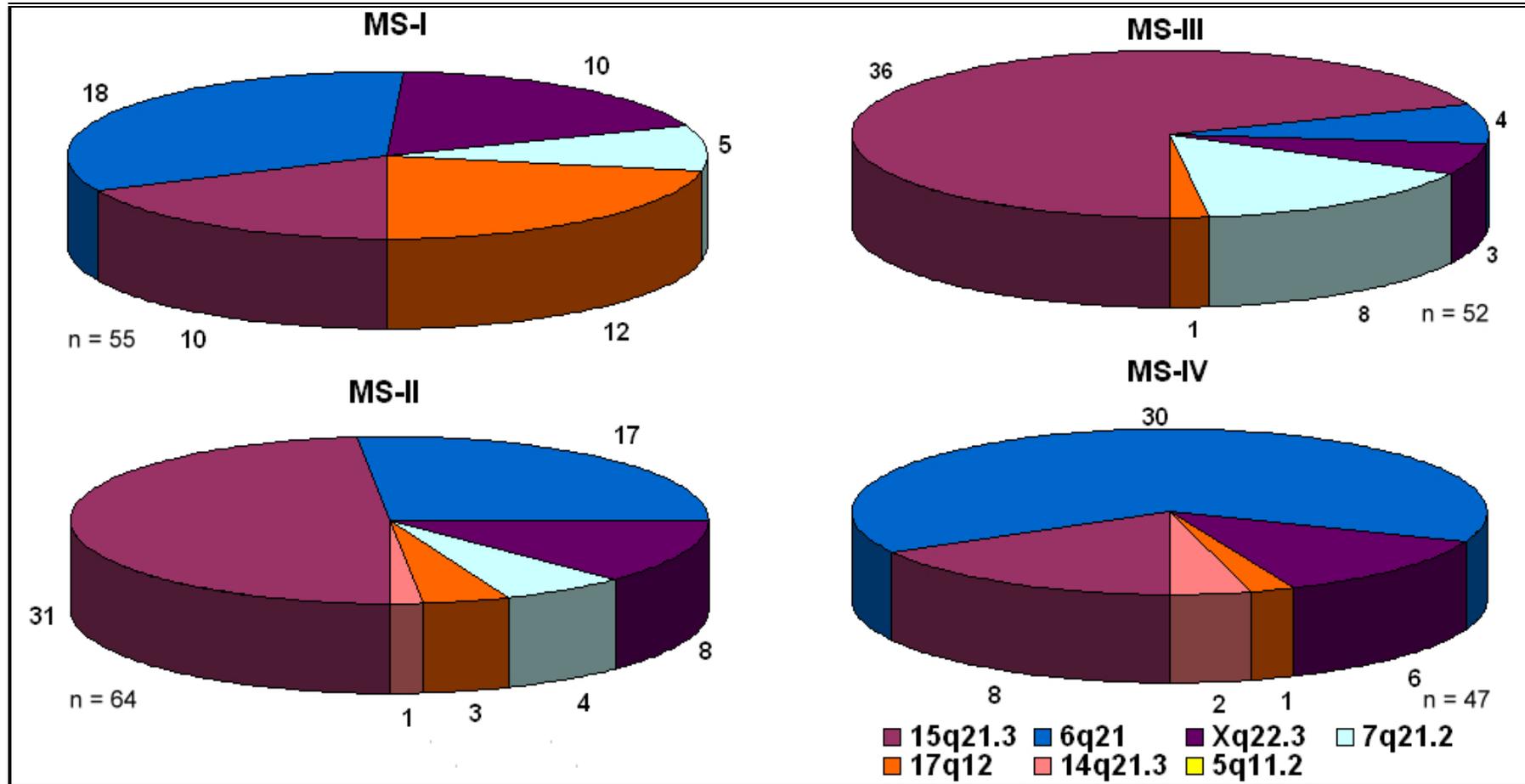


Abbildung 11: Klonierungsfrequenz der einzelnen HERV-W-*env* Loci bei vier Patienten mit MS. Alle Zahlenangaben sind absolut, d.h. bei MS-I wurde z.B. 10 mal das Provirus auf Chromosom 15q21.3 als Herkunftslocus nachgewiesen. Der relative Anteil der einzelnen Proviren an den gesamten Klonen eines Patienten ist anhand der Größe der Tortenstücke ersichtlich. Die schwankende Gesamtzahl an Klonen zwischen den Patienten ergibt sich durch die unterschiedliche Anzahl an rekombinanten Sequenzen mit unterschiedlicher Anzahl an beteiligten Loci.

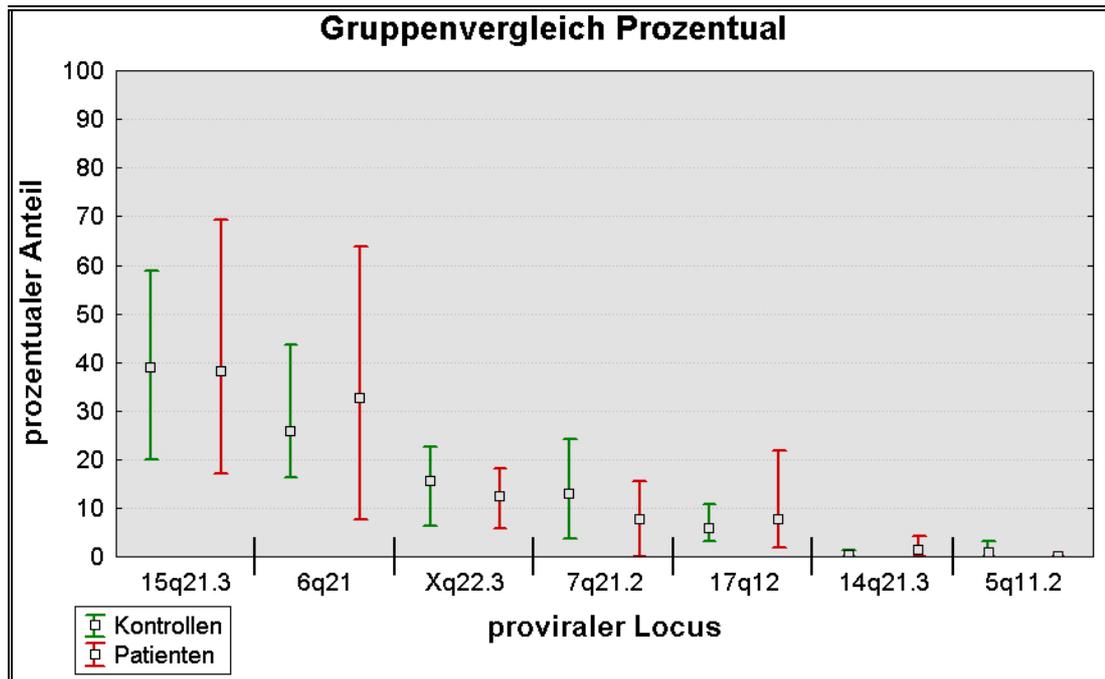


Abbildung 12: Whisker Boxplot zum Gruppenvergleich des prozentualen Anteils der einzelnen HERV-W Loci an den Transkripten von Patienten und Kontrollen. Der mittlere prozentuale Anteil eines Transkriptes an den Gruppen ist mit □ gekennzeichnet, die Whisker (=Balken) kennzeichnen den minimal bzw. maximal aufgetretenen prozentualen Anteil eines proviralen Locus. Der Anteil der Transkripte von Chr. 7q21.2 ist im Patientenkollektiv statistisch signifikant kleiner ($p = 0,0443$ mit Fisher's exact Test), ansonsten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

6.2 Analyse in der Literatur beschriebener MSRV – Sequenzen

Bei der Auswertung der Transkriptionsmuster der ausgewählten HERV-W-*env* Loci waren wie zuvor beschrieben zahlreiche Sequenzen aufgetreten, welche zu keinem der erfassten Loci eine gute Übereinstimmung aufwiesen (siehe Kap. 6.1.4). Jeder dieser Klone hätte für sich genommen, bei isoliertem Auftreten unter Umständen auch durch die Annahme des Vorhandenseins einer neuen retroviralen Sequenz in den PBMC-Proben erklärt werden können. Diese Erkenntnis führte zu der Überlegung, dass es sich bei den in der Literatur beschriebenen Sequenzen von MSRV ebenfalls um, möglicherweise im Rahmen der Klonierung *ex-vivo* entstandene, rekombinierte Transkripte von, im humanen Genom vorhandenen, HERV-W Loci handeln könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die in der Lite-

ratur beschriebenen MSRV-*env* und *gag* Sequenzen in Multiplen Alignments mit den in Frage kommenden HERV-W Loci im humanen Genom verglichen und bezüglich möglicher Rekombinationen, welche die Sequenzen erklären könnten, untersucht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Untersuchung anhand multipler Alignments dargestellt werden.

6.2.1 Analyse der MSRV-*env* Sequenzen

In der Literatur finden sich MSRV-*env* Sequenzen unter den GenBank Einträgen AF 127227, AF127228, AF127229 (Komurian-Pradel et al., 1999) und AF331500, (Perron et al., 2001) Die Sequenz AF331500 kann als MSRV-*env* Referenzsequenz betrachtet werden und wurde zur Herstellung und funktionellen Charakterisierung von MSRV-Env Proteinen verwandt. Die Sequenzen AF127227 und AF127229 wurden aus dem Plasma von Patienten mit MS durch RT-PCR gewonnen, die Sequenz AF127228 wurde aus extrazellulären Partikeln einer an rheumatoider Arthritis erkrankten Person amplifiziert und stammt somit nicht von einem an Multipler Sklerose erkrankten Patienten. Daher ist es interessant, dass ausgerechnet diese Sequenz einen längeren offenen Leserahmen aufweist und mit der 2001 von Perron et al. beschriebenen Sequenz AF331500 größtenteils identisch ist. Zur Herkunft der Sequenz AF331500 ist lediglich publiziert (Perron et al., 2001), dass sie einem cDNA-Klon entspricht, welcher nach den vormals beschriebenen Methoden amplifiziert wurde (Komurian-Pradel et al., 1999), was leider weder einen Rückschluss auf die Quelle der cDNA noch darauf, ob es sich hierbei um einen MS-Patienten handelte, zulässt. Mittels einer Blat-Search wurden bei allen im Folgenden dargestellten Alignments, die in Frage kommenden Herkunftsloci ermittelt und ein multigples Alignment erstellt, in welchem manuell nach Übereinstimmungen gesucht wurde. Hier dargestellte Alignments sind, zwecks Übersichtlichkeit, auf die tatsächlich an den Rekombinationen beteiligten Herkunftsloci beschränkt.

Zunächst wurde die Sequenz AF127227 auf mögliche Rekombinationen untersucht (siehe Abb. 13). Dabei stellte sich heraus, dass sie bis auf ein abweichendes Nukleotid auf einer Länge von 544 Basenpaaren auf einen HERV-W-*env* Locus auf Chromosom 3q23 zurückzuführen ist. Zwei zu Beginn der Sequenz liegende Mutationen stammen von den, zur Amplifikation der Sequenz verwandten, Primern.

chr3q23	1	CCTGGTAAGCCTATTTAATACCGCCCTCACTGGGCTCCATGAGGTCTCAGCCCAAACCC
AF127227	1G.....A.....C.....
chr3q23	61	TACTAACTGTTGGATGTGCCTCCCCCTGCACTTCAGGTCATACATTTCAATCCCTGTACC
AF127227	61
chr3q23	121	TGAACAATGGAACAACCTTCAGCACAGAAATAAACACCACTTCCGTTTTGGTAGGACCTCT
AF127227	121
chr3q23	181	TGTTTCCAATCTGGAAATAACCCATACCTCAAACCTCACCTATGTAAAATTTAGCAATAC
AF127227	181
chr3q23	241	TATAGACACAACCAACTCCCAATGCATCAGGTGAATAACTCCTCCACAGGAATAGTCTG
AF127227	241
chr3q23	301	CCTACCCCAGGAATA-TTTTTGTCTGTGGCACCTCAGCCTATCGTTGTTTGAATGGCTC
AF127227	301
chr3q23	360	TTCAGAATCTATGTGCTTCTCTCATTTCTTAGTGCCCCCTATGACCATCTACACTGAACA
AF127227	360
chr3q23	420	AGATTTATACAATTATGTTGTACCTAAGCCCTGCAACAAAAGAGTACCATTCTTCTCTTT
AF127227	420
chr3q23	480	TGTTATCAGAGCAGGAGTGCTAGGTGGACTAGGTGCTGGCATTGGCAGTATCACAACTC
AF127227	480
chr3q23	540	TACTC
AF127227	540

Abbildung 13: Alignment der MSRV – Sequenz AF127227 mit der genomischen Referenzsequenz auf Chr. 3q23. Die Bindungsbereiche der zur Amplifikation verwandten Primer sind grün markiert. Zu Beginn der Sequenz finden sich zwei Abweichende Nukleotide zum HERV-W Locus auf Chromosom 3q23 (rot), welche vom verwandten Forward Primer stammen. Das Cytosin an Position 43 (rot) ließ sich nicht durch ein Rekombinationsereignis erklären, während der Rest der Sequenz ab bp 44 vollständig mit dem HERV-W Provirus auf Chromosom 3q23 übereinstimmt.

Die Sequenz AF127228 codiert ein HERV-W-Env Protein für welches, abgesehen von einem Stop Codon ab Basenpaar 565, ein offener Leserahmen vorhanden ist. Ein analoges Stop Codon findet sich auch im Provirus auf Chromosom Xq22.3, welcher ebenfalls, abgesehen von diesem Stop, einen größeren offenen Leserahmen für ein HERV-W-Env Protein besitzt. Sowohl die Sequenz AF127228 als auch das Provirus auf Chromosom Xq22.3 besitzen weitere mögliche Startpunkte für die Translation nach dem beschriebenen Stop Codon, welche allerdings zu einem mindestens um die ersten 67 Aminosäuren verkürzten Env Protein ohne Signalpeptid führen würden (siehe Abb. 20). Der augenscheinlichste Unterschied zwischen den Sequenzen AF331500 und AF127228 ist eine Punktmutation, welche eben dieses Stop-Codon eliminiert und so den offenen *env*-Leserahmen um das Signalpeptid erweitert. Als nächstes wurde daher versucht, die Herkunft der als AF331500 bezeichneten, für

ein MSR-Env Protein kodierenden Sequenz (Perron et al, 2001) zu klären. Aufgrund der beschriebenen, weitreichenden Gemeinsamkeiten wurde diese Sequenz zusammen mit der älteren, als AF127228 bezeichneten Sequenz (Komurian-Pradel et al, 1999) in einem multiplen Alignment dargestellt (siehe Abb. 14).

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, ist die Sequenz AF127228 bis auf die letzten 32 Nukleotide weitestgehend mit der Sequenz des HERV-W Provirus auf Chromosom Xq22.3 identisch. Die abweichenden Nukleotide sind farbig (rot bzw. gelb) markiert. Zu Beginn und am Ende der Sequenz finden sich 7 vom Provirus auf Chr. Xq22.3 abweichende Basen, welche jedoch exakt der Sequenz der verwandten Primers entsprechen (grau markiert, siehe Tabelle 1, Komurian-Pradel et al., 1999). An Position 269 findet sich ein Adenin (rot) statt eines Guanins welches nicht durch eine Rekombination erklärt werden konnte. Auch an Position 472 und 1660 findet sich eine von der Sequenz auf Chr. Xq22.3 abweichende Base – jeweils Cytosin (rot) statt Thymin. Diese, nicht durch eine Rekombination zu erklärenden Mutationen, hat die Sequenz AF127228 mit der Sequenz AF331500 gemeinsam. An Position 1760 findet sich ein Guanin statt eines Adenins, welches sich durch eine Rekombination mit einem Provirus auf 4q31.1 erklären ließe. Nach Berücksichtigung einer möglichen Rekombination mit einem Provirus auf Chr. 4q31.1 verbleiben so, abgesehen von den abweichenden Nukleotiden im Bereich der Bindungsstelle des Reverse-Primers, nur 3 ungeklärte Mutationen auf einer Strecke von 1932 Basenpaaren (rot). Diese drei nicht erklärbaren, abweichenden Nukleotide liegen im Bereich der, in der Literatur beschriebenen, durch die Taq bedingten, normalen Fehlerrate des PCR-Verfahrens, welche mit 0,2 Basensubstitutionen / kb (Lundberg et al., 1991) bis zu 2,1 Basensubstitutionen / kb (Kheohavong & Thilly, 1989) angegeben wird. Bei den von uns vorgenommenen Klonierungen ergab sich nach der Berücksichtigung von Rekombinationsereignissen eine Taq-Fehlerrate von 0,98 pro Sequenz, was 1,54 Basensubstitutionen pro 1000 Nukleotiden entspricht. Somit wären in einem PCR-Produkt von 1932 bp Länge im Mittel 2,97 Nukleotidaustausche zu erwarten.

Die Sequenz AF331500 ist ebenfalls weitestgehend mit der des Provirus auf Chr. Xq22.3 identisch. Wie bereits beschrieben finden sich an Position 19 und 1209 jeweils ein Cytosin (rot) anstatt eines Thymins, was sich beides nicht durch Rekombinationen erklären ließ. An den Positionen 116 und 1309 findet sich jeweils Guanin anstatt Adenin (gelb), was jedoch z.B. durch Rekombinationen mit den Proviren auf Chromosom 7q21.2 bzw. Chromosom 4q31.1 erklärt werden könnte. Die Mutation bei Position 116 macht aus dem Stop-Codon des

Referenzprovirus auf Chr. Xq22.3 („TGA“, blau), welches auch in der Sequenz AF127228 vorhanden ist, das für die Aminosäure Tryptophan codierende Basentriplet TGG. Das bedeutet, auch das „mutierte“ Stopcodon an bp 116 läßt sich mit einer Rekombination erklären. Ab Basenpaar 1341 geht die Sequenz AF331500 nach einer Rekombination eindeutig auf einen HERV-W-*env* Locus auf Chromosom 5p12 zurück (grün markierte Nukleotide), was alle verbleibenden, von dem HERV-W-*env* Locus auf Chr. Xq22.3 abweichenden Nukleotide erklärt. Zusammenfassend lässt sich somit der mutmaßliche MSRV-Klon AF331500 unter Annahme einer Rekombination bis auf vier verbleibende Nukleotide mit den beiden HERV-W-*env* Loci von Chromosom Xq22.3, 5p12 erklären. Nimmt man sogar vier Rekombinationseignissen mit Beteiligung der Proviren auf Chromosom Xq22.3, 5p12 und 7q21.2 bzw. 4q31.1 an, so lässt sich die Sequenz AF331500 bis auf zwei verbleibende, abweichende Nukleotide auf HERV-W Loci zurückführen. Diese zwei bis vier Nukleotide Abweichung auf einer Strecke von 1629 Basenpaaren liegen, im Bereich der durch die Methode bedingten Fehlerrate.

ChrXq22.3	1	GAAATAGCCAGACCATTATATACACTAATTAAGGAAACTCAGAAAAGCCAATACCATTTAG
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	1	CC.....
ChrXq22.3	61	TAAGATGGGCACCTGAAGCAGAAGCAGCTTTCAGGCCCTAAAGAAGGCCCTAACCCAAG
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	61
ChrXq22.3	121	CCCCAGTGTTAAGCTTGCCAGTGGGGCAGACTTTTCTTTATATGTCACAGAAAAAACAG
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	121
ChrXq22.3	181	GAATAGCTCTAGGAGTCCTTACACAGGTCCGAAGGATGAGCTTGCAACCCATGGCGTACC
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	181
ChrXq22.3	241	TGAGTAAGGAAATTGATGTAGTGGCAAAGGATTGGCCTCATTGTTTATGGGTAGTGGCAG
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	241

ChrXq22.3	301	CAGTAGGAGTCTTAGTATCTGAAGCAGTTAAAATAATACAGGGAAGAGATCTTACTGTGT
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	301
ChrXq22.3	361	GGAATCTCATGATGTGAACGGCATGCTCACTGCTAAAGGAGACTTGTGACTATCAGACAA
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1	-----
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	361
ChrXq22.3	421	CTGTGAGGAAAGTAAC--AAATCATAAATCCCCATGGCCCTCCCTTATCATATTTTTCTC
Chr.7q21.2	1	-----
Chr4q31.1	1GA.....C.
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	1	-----
AF127228	421CC
ChrXq22.3	479	TTTACTGTTCTTACCCCTTTCGCTCTCACTGCACCCCTCCATGCTGCTGTACAACC
Chr.7q21.2	28T.....T.....A.....C.....TG...
Chr4q31.1	61A.....A.....A.....G.....CA.....TG...
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	28	-----
AF127228	479	-----
ChrXq22.3	539	AGTAGCTCCCCTTACCAAGAGTTTCTATGAGAACCGGGCTTCCCTGGAAATATTGATGCC
Chr.7q21.2	88G.....T..A..G..C.....
Chr4q31.1	121C.....G...CT.T.....CA.....A.....
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	88G.....
AF127228	539
ChrXq22.3	599	CCATCATATAGGAGTTTATCTAAGGGAAACTCCACCTTCACTGCCACACCCATATGCC
Chr.7q21.2	148G.....C.T.....C.C.....
Chr4q31.1	181T.....T.....T.....C..G..A..CA.....C.....
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	148	-----
AF127228	599	-----
ChrXq22.3	659	CGCAACTGCTATAACTCTGCCACTCTTTCATGCATGCAAATACTCATTATTGGACAGGG
Chr.7q21.2	208C.....A
Chr4q31.1	241	.A.....
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	208	-----
AF127228	659	-----
ChrXq22.3	719	AAAATGATTAATCCTAGTTGCTCTGGAGGACTTGGAGCCACTGTCTGTTGGACTTACTTC
Chr.7q21.2	268T.....
Chr4q31.1	301	..G..G.....T.....G
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	268	-----
AF127228	719	-----
ChrXq22.3	779	ACCATAACCAGTATGTCTGATGGGGTGAATTCAAGGTCAGGCAAGAGAAAAACAAGTA
Chr.7q21.2	328A..TG.....G.....A.....T...
Chr4q31.1	361G...TG.....GG.....A.....T...
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	328	-----
AF127228	779	-----

ChrXq22.3	839	AAGGAAGCAATCTCCCAACTGACCCGGGGACATAGCACCCCTAGCCCCTACAAAGGACTA
Chr.7q21.2	388	.A...T.....C.....T...G...T.....
Chr4q31.1	421T.....T...TG.....T.....A.....
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	388
AF127228	839
ChrXq22.3	899	GTTCTCTCAAACACTACATGAAACCCTCCGTACCCATACTCGCCTGGTGAGCCTATTTAAT
Chr.7q21.2	448	.A.....A.....
Chr4q31.1	481	.AG.....T.....A.....
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	448
AF127228	899
ChrXq22.3	959	ACCACCCTCACTCGGCTCCATGAGGTCTCAGCCCAAACCCCTACTAACTGTTGGATGTGC
Chr.7q21.2	508G.....G.....A...
Chr4q31.1	541G.....C..TG.....
chr5p12	1	-----
AF331500MSRV	508
AF127228	959
ChrXq22.3	1019	CTCCCCCTGCACTTCAGGCCATACATTTCAATCCCTGTTCTGAACAATGGAACAACCTC
Chr.7q21.2	568A.....TG.....A.....
Chr4q31.1	601	T...G.....A.....
chr5p12	10	T...A...A...T.....GTG.....A.....
AF331500MSRV	568
AF127228	1019
ChrXq22.3	1079	AGCACAGAAATAAACACCACTTCCGTTTTAGTAGGACCTCTTGTTTCCAATCTGGAAATA
Chr.7q21.2	628
Chr4q31.1	661T.....T.....T...G...
chr5p12	70	...C.....G.....A.....
AF331500MSRV	628
AF127228	1079
ChrXq22.3	1139	ACCCATACCTCAAACCTCACCTGTGTAATAATTTAGCAATACTATAGACACAACCAGCTCC
Chr.7q21.2	688C.T.....A....
Chr4q31.1	721T.....A....
chr5p12	130T.....A..A.A....
AF331500MSRV	688
AF127228	1139
ChrXq22.3	1199	CAATGCATCAGGTGGGTAACACCTCCACACGAATAGTCTGCCTACCCTCAGGAATATTT
Chr.7q21.2	748T.....A.....
Chr4q31.1	781T.....A.....
chr5p12	190	...G.....TG.....A.....T.....
AF331500MSRV	748
AF127228	1199
ChrXq22.3	1259	TTTGTCTGTGGTACCTCAGCCTATCATTGTTTGAATGGCTCTTCAGAATCTATGTGCTTC
Chr.7q21.2	808G.....
Chr4q31.1	841T.....G.....G...
chr5p12	250A.....AG.....
AF331500MSRV	808
AF127228	1259
ChrXq22.3	1319	CTCTCATTTCTTAGTGCCCCCTATGACCATCTACACTGAACAAGATTTATAACAATCATGTC
Chr.7q21.2	868G.T.....
Chr4q31.1	901C.....-...T.....T.....
chr5p12	310C.....T.....
AF331500MSRV	868
AF127228	1319

ChrXq22.3	1379	GTACCTAAGCCCCACAACAAAAGAGTACCCATTCTTCCTTTTGTATCAGAGCAGGAGTG
Chr.7q21.2	928	A..T.....G.....AG.....
Chr4q31.1	960	A.....T...T.....T.....TG.....
chr5p12	370	A.....TG.....C.....TG.....
AF331500MSRV	928
AF127228	1379
ChrXq22.3	1439	CTAGGCAGACTAGGTACTGGCATTGGCAGTATCACAACTCTACTCAGTTCTACTACAAA
Chr.7q21.2	988TGC.....G.....
Chr4q31.1	1020	...A.G.....G.....TG...A.....T...
chr5p12	430T.....G.....
AF331500MSRV	988
AF127228	1439
ChrXq22.3	1499	CTATCTCAAGAAATAAATGGTGACATGGAACAGGTCAGTCCCTGGTCACTTGCAA
Chr.7q21.2	1048C.....G.....G...G.C.....
Chr4q31.1	1080C.....TTG...CA...A.....
chr5p12	490	...T...C.....G...CA.....A.G..
AF331500MSRV	1048
AF127228	1499
ChrXq22.3	1559	GATCAACTTAACCTCCCTAGCAGCAGTAGTCCTTCAAATCGAAGAGCTTTAGACTTGCTA
Chr.7q21.2	1108
Chr4q31.1	1140C.....
chr5p12	550T...T.....
AF331500MSRV	1108
AF127228	1559
ChrXq22.3	1619	ACCGCCAAAAGAGGGGGAACCTGTTTATTTTAGGAGAAGAATGCTGTTATTATGTTAAT
Chr.7q21.2	1168	...TG.....G.....
Chr4q31.1	1200	..T..TG.....A.....G.....---.....C....
chr5p12	610G.....G.....
AF331500MSRV	1168
AF127228	1619
ChrXq22.3	1679	CAATCCAGAATTGTCACTGAGAAAAGTTAAAGAAATTCGAGATCGAATACAATGTAGAGCA
Chr.7q21.2	1228G...C.....C.....
Chr4q31.1	1257CA.....A.....CA...C..
chr5p12	670	...TG...CA.T.....T.....T.....
AF331500MSRV	1228
AF127228	1679
ChrXq22.3	1739	GAGGAGCTTCAAACACCGAACACTGGGGCCTCCTCAGCCAATGGATGCCCTGGGTTCTC
Chr.7q21.2	1288G.....T.G..C.....A.....
Chr4q31.1	1317AG..G.....T.....A...A...
chr5p12	730C.....T.C..C.....AC
AF331500MSRV	1288G.....AC
AF127228	1739G.....
ChrXq22.3	1799	CCCTTCTTAGGACCTCTAGCAGCTCTAATATTGTTACTCCTCTTGGACCCTGTATCTTT
Chr.7q21.2	1348A.....C.....
Chr4q31.1	1377A.....
chr5p12	790A.....T.....
AF331500MSRV	1348A.....T.....C
AF127228	1799
ChrXq22.3	1859	AACCTCCTTGTTAAGTTTGTCTCTCCAGAATTGAAGCTGTAAAGCTACAAATGGTTCTT
Chr.7q21.2	1408C.....C.....A.....-----
Chr4q31.1	1437	...T...T.....CA.....
chr5p12	850	...T.....A.....
AF331500MSRV	1408	...T.....A.....
AF127228	1859G.....CT.A

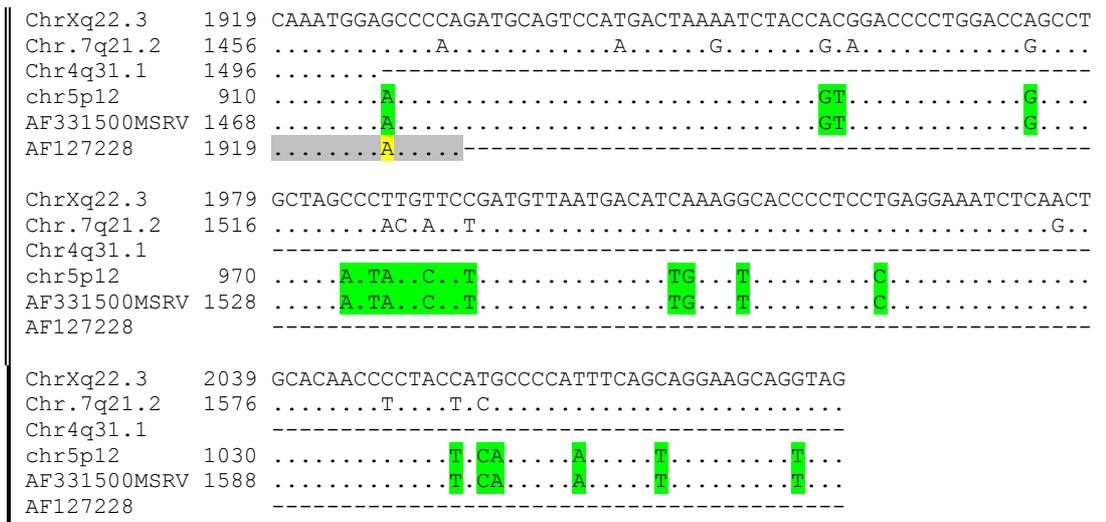


Abbildung 14: Multiples Alignment der MSRV-*env* Sequenzen AF331500 und AF127228 mit den, an diesen Sequenzen beteiligten HERV-W-*env* Loci. In den ersten vier Zeilen sind die Referenzsequenzen der relevanten Provi-
ren im humanen Genom angegeben. Wahrscheinlich von Rekombinationsereignissen stammende Nukleotide der
beiden MSRV-*env* Sequenzen sind farblich gekennzeichnet. **Gelb:** erklärable Nukleotidaustausche der Sequenzen
AF331500 und AF127228. **Grün:** Rekombination der Sequenz AF3311500 mit einem HERV-W Provirus auf Chro-
somosom 5p12. **Rot:** nicht erklärable Nukleotidaustausche der beiden MSRV-*env* Sequenzen. **Grau:** Primerbindungs-
bereich der Sequenz AF127228 **Blau:** Stop Codon im offenen Leserahmen des Provirus auf Chr. Xq22.3 und der
Sequenz AF127228. Näheres im Text (s.o.)

Abschließend wurde die Sequenz AF127229 hinsichtlich möglicher Rekombinationen analy-
siert. Dazu das multiple Alignment in Abbildung 15.



chr3p12.3	359	CACTGCTAAAGAAGACTTGTGGCTGTCAGACAACCATTACTTAAATAGCAGGTTCTATT
chr18q21.32	361G.....TG.....T...C.....
AF127229	359G.....
chr3p12.3	419	ACTTGAAGTGCCAGTGCCTGCGACTGCACATTTGTGCAACTCTTAACCCAGCCACATTTCT
chr18q21.32	421GT.....T.....G..C.....C.....
AF127229	419
chr3p12.3	479	TCCAGACAATGAAGAAAAGATAGAACATAACTGTCAACAAGTAATTGCTCAAACCTATGC
chr18q21.32	481	.A.....A.....
AF127229	479
chr3p12.3	539	TGCTCGAGGGGACCTTCTAGAGGTTCCCTTGACTGATCCCGACCTCAACTTGTATACTGA
chr18q21.32	541	C....A.....T.....A.....
AF127229	539
chr3p12.3	599	TGGAAGTTCCTTGGCAGAAAAGGACTTTGAAAAGCGGGGTAT-GCAGTGATCAGTGATA
chr18q21.32	601T.T.....CA....T.....G.....G.....
AF127229	599
chr3p12.3	658	ATGGAATACTTGAAGTAATCGCCTCACTCCAGGAAGTAGTGCTCACCTGGCAGAACTAA
chr18q21.32	661C.....C.....G.....
AF127229	658
chr3p12.3	718	TAGCCCTCACTTGGGCACTAGAATTAGGAGAAGGAAAAGGGTAAATATATATTCAGACT
chr18q21.32	721	...T.....CA..A.....G.....A...C..
AF127229	718
chr3p12.3	778	CTAAGTATGCTTACCTAGTCCTCCATGCCCATGCAGCAATATGGAGAGAGAGGAATTCC
chr18q21.32	781G.....T.....A.....
AF127229	778
chr3p12.3	838	TAAGTCTGAGGGAACACCTATCAACCATCAGGAAGCCATTAGGAGATTATTATTGGCTG
chr18q21.32	841CA.....AG...A.....T.....A.C..C..
AF127229	838
chr3p12.3	898	TACAGAAACCTAAAGAGGTGGCAGTCTTACACTGCCAGGGTCATCAGAAAGAAGAGGAAA
chr18q21.32	901A.....-....
AF127229	898
chr3p12.3	958	GGGAAATAGAAGGCAATCGCCAAGCGGATATTGAAGCAAAAAAGCCGCAAGGCAGGACT
chr18q21.32	956G....A.G..CT.....T.....TC....G..-A.....C
AF127229	958
chr3p12.3	1018	CTCCATTAGAAATGCTTATAGAAGGACCCCTAGTATGGGGTAAATCCCCTCTGGGAAACCA
chr18q21.32	1015	T.....TG.....A.....
AF127229	1018
chr3p12.3	1078	AGCCCCAATACTCAGCAGAAGAAATAGAAT-GGGAACCTCATGAAGACATAGTTTCTCC
chr18q21.32	1075G.....G.A.....A..A.....CA.G.....C.....
AF127229	1078G.....G.A.....A..A.....CA.G.....C.....
chr3p12.3	1137	CCTCAGGATGGCTAGCCACCAAAGAAGGAAAAATACTTTTGCTTGAGCTAACCAATGGA
chr18q21.32	1135	...CA.....TG.G.....CA.C.....CA..
AF127229	1138	...CA.....TG.G.....CA.C.....CA..
chr3p12.3	1197	AATTACTTAAAACCTTCACCAAACCTTTCACTTAGGCATTGACAGCACCCATCAGATGA
chr18q21.32	1195C.....T.....G
AF127229	1198C.....T.....G
chr3p12.3	1257	CCAACTATTATTACTGGACCAGACCTTTTCAAACCTATCAAGCAGATAGTCAGGGCCT
chr18q21.32	1255T.....G.....A.....G..
AF127229	1258T.....G.....A.....G..

chr3p12.3	1317	GTGAAGTGTGCCAAAGAAATAATCCCCTGCACTGTAGGCCATACATTTCAATCCCTCTAT
chr18q21.32	1315C.....G...
AF127229	1318C.....G...
chr3p12.3	1377	TTTTAATCTCCTTGATAACTTTGTCTCTTCCAGAATCAAAGCTGTAAACTACAAATCGT
chr18q21.32	1375	C.....C.....T...G.....A.C.....T..
AF127229	1378	C.....C.....T...G.....A.█.....T..
chr3p12.3	1437	TCTTCAAATGGAGCCCCAGATGCAGTCCATGACTAAGATCTACCGCAGACCCCTGGACCA
chr18q21.32	1435A.....G.....C...TG.....G
AF127229	1438A.....G.....C...TG.....G
chr3p12.3	1497	GCCTGCTAGCCCATGCTCTGATGTTAATGACATCGAAGGCACCCCTCCCGAGGAAATCTG
chr18q21.32	1495C.....T.....C
AF127229	1498C.....T.....C
chr3p12.3	1557	AACTGCACAACCCCTACTATGCCCAATTCAGCAGGAAGCAGTTAGTGCAGACATCAGTC
chr18q21.32	1555G.....A..G.T.....C.
AF127229	1558G.....A..G.T.....C.
chr3p12.3	1617	GACTTCCCCAACAGCACTTGGGTTTTCTGTTGAGAGAGGGTACTGAGAGACAGGACTAG
chr18q21.32	1615	A..C.....G...G.....
AF127229	1618	A..C.....G...G.....
chr3p12.3	1677	CTGGATTTCTAGGCCAACTAAGAATCCCTAAGCCTAGCTGGGAAGGTGACCGCATCCAC
chr18q21.32	1675G.....T.....
AF127229	1678G.....T.....
chr3p12.3	1737	CTTTAAACACGGGGCTTGCAACTTAGAGCACG-CCAACAAATCAGGTAGTAAAGACAGCT
chr18q21.32	1735	..C.....T.....CT...AC..G..C.....G....
AF127229	1738	..C.....T.....CT...AC..G..C.....G....
chr3p12.3	1796	CGCTAAAATGCTAATTAGGCAAAAACAGGAGGTAAAGAAATAGCCAATCATCTATCACCT
chr18q21.32	1786	.A.....T.....TG...
AF127229	1789	.A.....T.....TG...
chr3p12.3	1856	GACAGCACAGCGAGAGGGAAAATGATCAGAATATAAACCCAGGCATTTGAACCATCAACG
chr18q21.32	1846	..G.....G.....C..G...G.G.....C..G..GG....
AF127229	1849	..G.....G.....C..G...G.G.....C..G..GG....
chr3p12.3	1916	GCTACCCTCTTTGGATCCCCTCCCTTGTATGGGAGCTCTGT-----TTTCACAC
chr18q21.32	1906	..A...C.....G.....C.....TTTCACTCTA.....T.
AF127229	1909	..A...C.....G.....C.....TTTCACTCTA.....T.
chr3p12.3	1966	TATTAATCTTGCAACTGCAAAAAAAAAAAGAAAA
chr18q21.32	1966A.....
AF127229	1969A.....

Abbildung 15: Multiples Alignment der MSRV-*env* Sequenz AF127229 mit den, an dieser Sequenz beteiligten HERV-W-*env* Loci. Die Nukleotide 1 – 1084 der Sequenz AF127229 stimmen, mit Ausnahme eines nicht erklärbar Nukleotidaustausch bei bp 944 (rot), mit dem HERV-W Provirus auf Chromosom 3p12.3 überein. Ab Basenpaar 1085 stimmt die Sequenz dann, bis auf einen nicht erklärbaren Basenaustausch bei Position 1419 (rot), an allen charakteristischen Stellen mit dem HERV-W-*env* Locus auf Chromosom 18q21.32 überein. Das Adenin bei bp 1999, welches ebenfalls nicht bei einem der beiden Referenzproviren zu finden ist, liegt im Bindungsbereich des antisense Primers und lässt sich dadurch erklären. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei der Sequenz ebenfalls um eine *ex-vivo* Rekombination von mRNA der beiden genannten proviralen Loci handelt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sämtliche hier untersuchten, bisher sogenannten MSRV-*env* Sequenzen durch HERV-W-*env* Sequenzen oder Rekombinationen zwischen

HERV-W-*env* Sequenzen gut zu erklären sind. Das maßgeblich an den MSRV Sequenzen AF127227, AF127228 und AF331500 beteiligte HERV-W Provirus auf Chromosom Xq22.3 wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen als in PBMC transkriptionsaktiv identifiziert. Auch das unter Umständen an Rekombinationen der Sequenzen AF127228 und AF331500 beteiligte Provirus auf Chromosom 7q21.2 stellte sich in unseren Experimenten als transkriptionsaktiver HERV-W Locus heraus. Über die Transkriptionsaktivität der anderen an den MSRV-Sequenzen beteiligten HERV-W Loci lässt sich mit den durchgeführten Experimenten keine Aussage treffen, da die verwandten Primer die Proviren auf den Chromosom 3q23, 3p12.3, 4q31.1, 5p12 und 18q21.32 nicht erfassen.

6.2.2 Analyse der MSRV-*gag* Sequenz

Ergänzend bot sich an, mit der in dieser Arbeit verwandten Methode auch eine mutmaßliche MSRV-*gag* Sequenz, AF123881 (Komurian-Pradel et al., 1999), auf ihren Ursprung hin genauer zu analysieren. Wie die anderen von Komurian-Pradel beschriebenen MSRV-Sequenzen wurde auch diese aus cDNA amplifiziert, welche aus dem Plasma von MS-Patienten gewonnen worden war. Bei der Auswertung zeigte sich, dass die Sequenz außerhalb der Bindungsbereiche der PCR-Primer bis auf zwei Nukleotide Unterschied mit einem HERV-W Provirus auf Chromosom 3q26.32 übereinstimmt und somit davon auszugehen ist, dass auch dieses mRNA Transkript von einem endogenen HERV-W Locus abstammt.

chr3q26.32	1	CCTAAGATGTATTCTGGAGAATTGGGACCAATGTGACACTCAGACGCTAAGAAAGAAACG
AF123881	1GA.C.....
chr3q26.32	61	ATTTATATTCTTCTGCAGTACCGCCTGGCCACAATATCCTCTTCAAGGGAGAGAAACCTG
AF123881	61
chr3q26.32	121	GCTTCCTGAGGGAAGTATAAATTATAACATCATCTTACAGCTAGACCTCTTCTGTAGAAA
AF123881	121
chr3q26.32	181	GGAGGGCAAATGGAGTGAAGTGCCATATGTGCAAACCTTTCTTTTCATTAAGAGACAACCTC
AF123881	181
chr3q26.32	241	ACAATTATGTAAAAAGTGTGGTTTATGCCCTACAGGAAGCCCTCAGAGTCCACCTCCCTA
AF123881	241
chr3q26.32	301	CCCCAGCGTCCCCTCCCCGACTCCTTCCTCAACTAATAAGGACCCCCCTTTAACCCAAAC
AF123881	301
chr3q26.32	361	GGTCCAAAAGGAGATAGACAAAGGGTAAACAATGAACCAAAGAGTGCCAATATCCCCG
AF123881	361
chr3q26.32	421	ATTATGCCCCCTCCAAGCAGTGAGAGGAGAGAATTCGGCCAGCCAGAGTGCCTGTACC
AF123881	421

chr3q26.32	481	TTTTTCTCTCTCAGACTTAAAGCAAATTAAAAATAGACCTAGGTAAATTCTCAGATAACCC
AF123881	481
chr3q26.32	541	TGACGGCTATATTGATGTTTTACAAGGGTTAGGACAATCCTTTGATCTGACATGGAGAGA
AF123881	541
chr3q26.32	601	TATAATGTTACTACTAAATCAGACACTAACCCCAAATGAGAGAAGTGCCGCTGTAAGTGC
AF123881	601
chr3q26.32	661	AGCCCGAGAGTTTGGCGATCTTTGGTATCTCAGTCAGGTCAACAATAGGATGACAACAGA
AF123881	661
chr3q26.32	721	GGAAAGAACAACCTCCACAGGCCAGCAGGCAGTTCCCAGTGTAGACCCTCATTGGGACAC
AF123881	721
chr3q26.32	781	AGAATCAGAACATGGAGATTGGTGCCACAAACATTTGCTAACTTGCCTGCTAGAAAGGACT
AF123881	781
chr3q26.32	841	GAGGAAAACCTAGGAAGAAGCCTATGAATTACTCAATGATGTCCACTATAACACAGGGAAA
AF123881	841
chr3q26.32	901	GGAAGAAAATCCTACTGCTTTTCTGGACAGACTAAGGGAGGCATTGAGGAAGCATAACCTC
AF123881	901
chr3q26.32	961	CCTGTCACCTGACTCTATTGAAGCCAACATACTTAAAGGATAAGTTTATCACTCAGTC
AF123881	961
chr3q26.32	1021	AGCTGCAGACATTAGAAAAAACTTCAAAAGTCTGCCTTAGGCCCGGAGCAGAACTTAGAA
AF123881	1021
chr3q26.32	1081	ACCCTATTTAACTTGGCATCCTCAGTTTTTTATAATAGAGATCAGGAGGAGCAGGCGAAA
AF123881	1081
chr3q26.32	1141	CGGGACAAACGGGATAAAAAAAAAAGGGGGGTCCACTACTTTAGTCATGGCCCTCAGGC
AF123881	1141
chr3q26.32	1201	AAGCAGACTTTGGAGGCTCTGCAAAAGGGAAAAGCTGGGCAAATCAAATGCCTAATAGGG
AF123881	1201
chr3q26.32	1261	CTGGCTTCCAGTGCGGTCTACAAGGACACTTTAAAAAAGATTATCCAAGTAGAAATAAGC
AF123881	1261
chr3q26.32	1321	CGCCCCCTTGTCATGCCCCCTTACGTCAAGGAATCACTGGAAGGCCACTGCCCCAGGG
AF123881	1321
chr3q26.32	1381	GATGAAGATACTCTGAGTCAGAAGCCATTAACCAGATGATCCAGCAGCAGGACTGAGGGT
AF123881	1381
chr3q26.32	1441	GCCCGGGGCGAGCGCCAGCCCATGCCATCACCCCTCACAGAGCCCCGGGTATGCTTGACCA
AF123881	1441T.....
chr3q26.32	1501	TTGAGAGCCAG
AF123881	1501A

Abbildung 16: Alignment der MSRV-gag Sequenz AF123881 mit der genomischen Referenzsequenz auf Chr 3q26.32. Im Bindungsbereich der PCR-Primer (grau hinterlegt) gibt es fünf abweichende Nukleotide (gelb), welche sich durch eine nicht zu 100% komplementäre Sequenz der Primer erklären lassen (siehe Komurian-Pradel et al. 1999). Abgesehen davon finden sich nur zwei Nukleotide, welche nicht mit dem Herkunftslocus übereinstimmen - an Position 698 und an Position 911 (rot). Die erste Mutation ergibt einen Austausch von Alanin gegen Valin, die zweite einen von Leucin gegen Prolin.

6.2.3 Herkunft der Vollängen MSR_V-*pol* Sequenz

1997 wurde eine mutmaßliche MSR_V-*pol* Sequenz veröffentlicht, welche aus dem Ultrazentrifugat einer Zellkultur von Plexus Choroideus – Zellen amplifiziert worden war (Perron et al., 1997). Diese choroidalen Zellen waren zuvor mit einem Extrakt, hergestellt aus einer Kultur leptomeningealer Zellen aus dem Liquor von MS-Patienten (LM7) infiziert worden, welches, so die Hypothese, MSR_V übertragen sollte. Aus dem Ultrazentrifugat von 2,5 Litern Überstand der Choroidzellkultur wurde cDNA hergestellt und diese ohne PCR-Schritt kloniert und sequenziert. Dabei wurde eine Sequenz (PSJ17) beobachtet, welche eine partielle Homologie zu einer bekannten ERV9 *pol* Sequenz zeigte. Vorher hatte man bereits mit degenerierten Primern, d.h. zahlreiche bekannte Retroviren erfassenden Primern, in choroidalen Zellen von MS-Patienten sowie mit LM7 Extrakt „infizierten“ choroidalen Zellen von Gesunden eine bis dahin unbekannte 85 Basenpaare umfassende sogenannte MSR_V-consensus-*pol* (*cpol*) Sequenz amplifiziert. Nach der Blat-Suche dieser MSR_V-*cpol* Sequenz zeigt sich jedoch, dass die Sequenzen zu 100% mit den *pol*-Genen von HERV-W Proviren auf Chromosom Xq22.3 sowie auf Chromosom 6q27 übereinstimmt. Anschließend wurde von Perron et al. mit Primern, basierend auf dieser mutmaßlichen MSR_V-*cpol* Sequenz, sowie dem Klon PSJ17 eine 740bp langes Fragment aus dem Überstand der mit dem LM7 Virus „infizierten“ Choroidzellkulturen amplifiziert. Sowohl die Sequenz der verwandten Primer als auch das erhaltene Fragment sind nicht publiziert. Mittels eines RT-PCR-Ansatzes unter Zuhilfenahme ebenfalls unpublizierter Primer wurden im Überstand der genannten Plexus Choroideus – Zellkulturen Abschnitte auf der 5' und 3' Seite des Fragmentes amplifiziert. Die dabei erhaltene Sequenz mit einer Gesamtlänge von 2304 bp wurde als MSR_V-*pol* mit der Gen-Bank Nummer AF009668 veröffentlicht. Die Lage der verwandten Primer sowie des Ursprünglichen PSJ17 Klons läßt sich aufgrund fehlender Angaben nicht nachvollziehen. Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, diese mutmaßliche MSR_V-*pol* Sequenz auf endogene HERV-W Kopien zurückzuführen. Dabei zeigte sich, dass die ersten 600 Basen der Sequenz, d.h. die gesamte für die Protease kodierende Region, bis auf drei Nukleotide Abweichung, welche vermutlich von Sequenzierfehlern herrühren, auf ein endogenes HERV-W Provirus auf Chromosom 1p34.2 zurückzuführen sind. Die letzten 567 Nukleotide der Sequenz lassen sich bis auf zwei Ausnahmen einem HERV-W Provirus auf Chromosom 3p12.3 zuordnen. Der zwischen diesen beiden Abschnitten liegende Bereich kann unter Annahme von Rekombinationen bis auf wenige Nukleotide ebenfalls geklärt werden, eine

schlüssige Zuordnung ist jedoch nur in Kenntnis der zur Amplifikation genutzten Primer und der dadurch verursachten Abweichungen sinnvoll möglich.

Die in mehreren später durchgeführten Studien zur Detektion von MSRV Transkripten im Serum, Liquor und anderen Geweben von Patienten mit MS und Kontrollen genutzten Primer basieren auf dieser von Perron et al. generierten MSRV-*pol* Sequenz AF009668 (Garson et al., 1998 / Serra et al., 2001 / Dolei et al., 2002 / Sotgiu et al., 2002 / Mameli et al., 2007). Die in allen genannten Studien verwandten beiden Oligonukleotidpaare einer Nested – PCR erkennen allerdings neben der von Perron 1997 veröffentlichten MSRV-*pol* Sequenz, AF009668, auch ein auf Chromosom 6q27 gelegenes HERV-W Provirus. Dessen dabei amplifiziertes *pol* – Segment stimmt zu 98 % mit dem entsprechenden Abschnitt der MSRV-*pol* Sequenz überein. (siehe Abb. 17) Dies bedeutet, dass der entsprechende Abschnitt der MSRV-*pol* Sequenz aufgrund einer Rekombination höchstwahrscheinlich der *pol* Sequenz des HERV-W Provirus auf Chromosom 6q27 zuzuordnen ist.

TCCAGCAGCA	GGACTGAGGG	TGCCCCGGGGC	AAGTGCCAGC	CCATGCCATC	50	
ACCCTCAGAG	CCCCGGGTAT	GTTTGACCAT	TGAGAGCCAG	GAAGTAACT	100	
GTCTCCTGGA	CACTGGCGCA	GCCTTCTCAG	TCTTACTTTC	CTGTCCCAGA	150	
CAATTGTCTT	CCAGATCTGT	CACTATCCGA	GGGGTCCTAG	GACAGCCAGT	200	
CACTACATAC	TTCTCTCAGC	CACTAAGTTG	TGACTGGGGA	ACTTTACTCT	250	
TTTCACATGC	TTTTCTAATT	ATGCCTGAAA	GCCCCACTC	CTTGTTAGGG	300	
AGAGACATT	TAGCAAAAAGC	AGGGGCCATT	ATACACCCTGA	ACATAGGAAA	350	
AGGAA	TACCC	ATTTGCTGTC	CCCTGCTTGA	GGAAGGAATT	AATCCTGAAG	400
TCTGGGCAAT	AGAAGGACAA	TATGGACAAG	CAAAGAATGC	CCGTCTGT	450	
CAAGTTAAAC	TAAAGGATTC	TGCCTCCTTT	CCCTACCAA	GGAAGTACCC	500	
TCTTAGACCC	GAGGCCCTAC	AAGGAhCTCA	AAAGATTGTT	AAGGACCTAA	550	
AAGCCCAAGG	CCTAGTAAAA	CCATGCAGTA	GCCCCTGCAA	TACTCCAATT	600	
TTAGGAGTAa	gGAAACCCAA	CGGACAGTGG	AGGtTAGTgC	AAGATCTCAG	650	
GATTATtAAT	GAGGctGTTt	TTCCTCTATA	CCCAGCTGTA	tCTAgCCCTT	700	
ATACTcTGCT	TTCCctAATA	CCAGAGGAaG	CAGAGTGGTT	TACAGTCCTG	750	
GACcTTAAgG	ATGCCTTTTT	CTGCATCCCT	GTACgtcctg	actctcaaTT	800	
CTTGTTTGCC	TTTGAAGATC	CTTtgAACCC	AACgTCTCAA	CTCACCTGGA	850	
cTGTTTTACC	CCAAGGGTTC	AGGGATAGcC	CCCATCTATT	TGGCCAGGCA	900	
TTAGCCCAAG	ACTTGAGtCA	ATTCTCATAc	CTGGACACTC	TTGTCTTCA	950	
GTACgTGGAT	GATTTACTTT	TAGTCGCCCC	TTCAGAAACC	TTGTGCCATC	1000	
AAGCCACCCA	AGAActCTTA	AcTTTCTCA	CTACCTGTGG	CTACAAGGTT	1050	
TCCAAACCAA	AGGCTCGGCT	CTGCTCACAG	gAGATTAGAT	ACTtAGGGCT	1100	
AAAATTATCC	AAAGGCACCA	GGGCCCTCAG	TGAGGAACGT	ATCCAGCCTA	1150	
TACTGGCTTA	TCCTCATCCC	AAAACCCATA	AGCAACTAAG	AGGGTTCCTT	1200	
GGCATAACAG	GTTTCTGCCG	AAAACAGATT	CCCAGGTACA	cCCcAATAGC	1250	
CAGACCATTA	TATACACTAA	TTAgGGAAAC	TCAGAAAGCC	AATACCTATT	1300	
TAGTAAGATG	GACACCTACA	GAAGTGGCTT	TCCAGGCCCT	AAAGAAGGCC	1350	
CTAACCCAAG	CCCCAGTGTT	CAGCTTGCCA	ACAGGGCAAG	ATTTTTCTTT	1400	
ATATGCCACA	GAAAAACAG	GAATgGCTCT	AGGAGTCCTT	AcCCAGGTCT	1450	
cAGGGATGAG	CTTGCA	ACCc	gTGGtATACC	TGAGTAAGGA	AAtTGATGTA	1500
GTGGCAAAGG	GTTGGCCTCA	TTGTTTATGG	GTAaTGgcGG	CAGTAGCAGT	1550	

CTTAGTATCT	GAAGCAGTTA	AAATAATACA	GGGAAGAGAT	CTTACTGTGT	1600
GGACATCTCA	TGATGTGAAc	GGCATACTCA	CTGCTAAAGg	AGACTTGTGG	1650
tTGTCAGACA	ACcaTTTaCT	TAAtTATCAG	GCTCTATTAC	TTGAAGaGCC	1700
AGTGcGaGA	CTGCGCACTT	GTGCAACTCT	TAAaCCcGCC	ACATTTCTTC	1750
CAGACAATGA	AGAAAAGATA	GAACATAACT	GTCAACAAGT	AATTGCTCAA	1800
ACCTATGCTG	CTCGAGGGGA	CCTTCTAGAG	GTTCCCTTGA	CTGATCCCGA	1850
CCTCAACTTG	TATACTGATG	GAAGTTCCTT	GGCAGAAAAA	GGACTTcGAA	1900
AAGCGGGGTA	TGCAGTGATC	AGTGATAATG	GAATACTTGA	AAGTAATCGC	1950
CTCACTCCAG	GAAC TAGTGC	TCACCTGGCA	GAACTAATAG	CCCTCACTTG	2000
GGCACTAGAA	TTAGGAGAAG	GAAAAAGGGT	AAATATATAT	TCAGACTCTA	2050
AGTATGCTTA	CCTAGTCCTC	CATGCCCATG	CAGCAATATG	GAGAGAGAGG	2100
GAATTCCTAA	CTTCTGAGGG	AACACCTATC	AACCATCAGG	AAGCCATTAG	2150
GAGATTATTA	TTGGCTGTAC	AGAAACCTAA	AGAGGTGGCA	GTCTTACACT	2200
GCCAGGGTCA	TCAGcAAGAA	GAGGAAAAGG	AAATAGAAGG	CAATCGCCAA	2250
GCGGATATTG	AAGCAAAAAA	AGCCGCAAGG	CAGGACTCTC	CATTAGAAAT	2300
GCTT					

Abbildung 17: Durch HERV-W Loci erklärbare Abschnitte der MSRV-*pol* Sequenz AF009668. Hellgrau hinterlegt der 526 Nukleotide lange Bereich der Sequenz, welcher sich per Blast-Search einem HERV-W Provirus auf Chromosom 1p34.2 zuordnen lässt. Darin ist in blauer Schrift die Protease – Region gekennzeichnet. Violett hinterlegt der 567 Basenpaare lange Abschnitt am Ende der MSRV-*pol* Sequenz, welcher sich von dem HERV-W Locus auf Chromosom 3p12.3 ableitet. Grün markiert bzw. unterstrichen sind die Bindungsbereiche, der in den Studien zur Detektion von MSRV-*pol* Transkripten genutzten Primer (siehe Kap. 7) (Nested – PCR Ansatz). Der Gelb hinterlegte Abschnitt der MSRV-*pol* Sequenz, welcher von ihnen erfasst wird, weist eine hohe Übereinstimmung mit einem HERV-W Provirus auf Chromosom 6q27 auf. Rot markiert sind die vom jeweiligen HERV-W Referenzlocus abweichenden Nukleotide der MSRV-*pol* Sequenz. Diese könnten zum Teil von den ursprünglich zur Herstellung der MSRV-*pol* Sequenz verwandten (unveröffentlichten) Primern stammen .

6.3 Orientierung der HERV-W-*env* Xq22.3 Transkripte

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass das HERV-W Provirus auf Chromosom Xq22.3 *in-vivo* Transkripte herstellt (Kap. 6.1.5), über weite Strecken identisch mit den in der Literatur beschriebenen MSRV-*env* Klonen AF127228 und AF331500 ist und wie diese ebenfalls einen größeren offenen Leserahmen besitzt, stellte sich die Frage, ob dieser Locus möglicherweise dazu in der Lage sein könnte, ein HERV-W-Env Protein zu produzieren. Eine Voraussetzung hierfür ist eine korrekte Orientierung der Transkripte in Richtung des Offenen Leserahmens mit dem Startcodon ATG am 5' Ende der mRNA. Diese Aussage ließ sich nach dem für die Klonierung angewandten Verfahren der Reversen Transkription der mRNA mittels „random hexamer“ Primern nicht mehr treffen, da diese Primer die unspezifische Umwandlung jeglicher RNA in cDNA ermöglichen. Um dennoch bestimmen zu können, ob die detektierten Transkripte dieser HERV-W Kopie in der richtigen Orientierung vorliegen

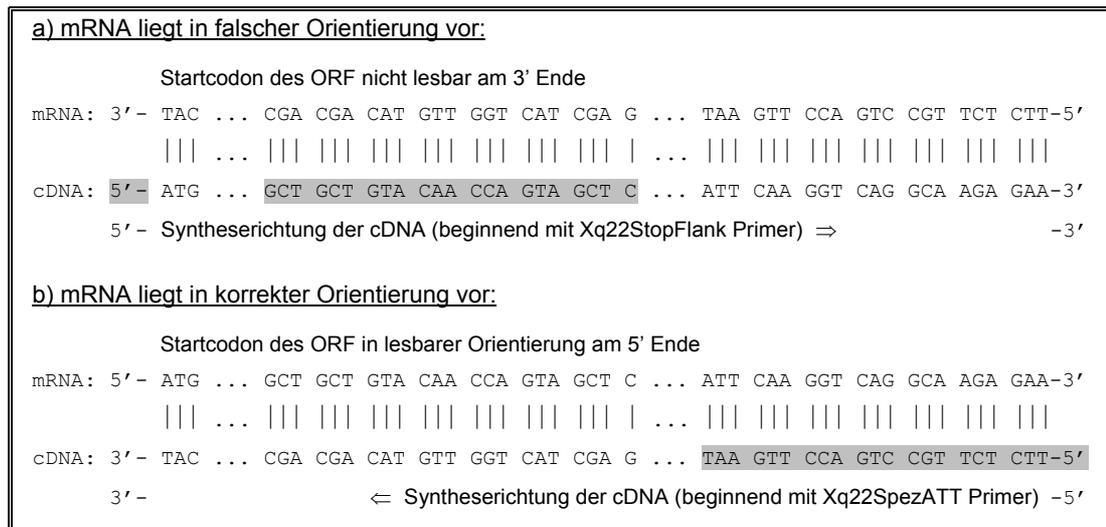


Abbildung 18: Prinzip der Reversen Transkription mit für das Transkript spezifischen Primern. Gezeigt sind die beiden möglichen Orientierungen der nachgewiesenen HERV-W-*env* mRNA Transkripte vom Chromosom Xq22.3. Jeweils am Anfang der mRNA, „links“ des, bei dieser Reversen Transkription, in cDNA umgeschriebenen Abschnittes, ist das Startcodon des ORF für das HERV-W-Env Protein angegeben. Nur wenn sich dieses am 5' Ende der mRNA befindet, könnten die Transkripte für die Translation eines Env Proteins dienen. Dies ist bei Möglichkeiten b) der Fall. Unter der mRNA ist jeweils die Sequenz der daraus synthetisierten cDNA wiedergegeben. Da die Synthese der cDNA ebenfalls nur in 5' – 3' Richtung stattfinden kann, muss der für die Synthese der cDNA dienende Primer am 3' Ende der mRNA binden können. Die für die Reverse Transkription verwandten Primer sind grau hinterlegt. Liegt die mRNA also in „korrekter“ Orientierung vor [wie unter b)], so kann der Antisense Primer „Xq22SpezATT“ am 3' Ende der mRNA Transkripte binden und ermöglicht die Synthese einer cDNA. Da der Sense Primer in diesem Fall aufgrund seiner identischen Nukleotidsequenz nicht an diese mRNA Transkripte binden kann, wird in dem Reversen-Transkriptionsansatz, welcher mit dem Xq22Stop-Flank Primer versehen wurde keine cDNA synthetisiert werden.

und somit evtl. *in-vivo* Teile eines HERV-W-Env Proteins synthetisiert werden könnten, wurde eine reverse Transkription von RNA mit je nur einem für das Gen spezifischen Primer durchgeführt (siehe Abb. 18). Das heißt, es wurden für die Reverse Transkription getrennte Ansätze mit je nur dem für dieses Gen spezifischen Sense bzw. Antisense Primer (Xq22StopFlank bzw. Xq22SpezATT) und die jeweiligen Kontrollen (ohne Zugabe von Reverser Transkriptase) prozessiert. Würde sich in einer anschließenden PCR nur in der Probe mit dem Antisense Primer die entsprechende 305 bp lange HERV-W Xq22.3 Sequenz amplifizieren lassen, so wäre gezeigt, dass die mRNA in für die Proteinsynthese korrekter Orientierung vorgelegen haben muss (siehe Abb. 18). Nach Durchführung der beschriebenen genspezifischen Reversen Transkription wurde die so gewonnene cDNA einer PCR mit den gleichen, auch für die RT verwandten Primern unterzogen. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis

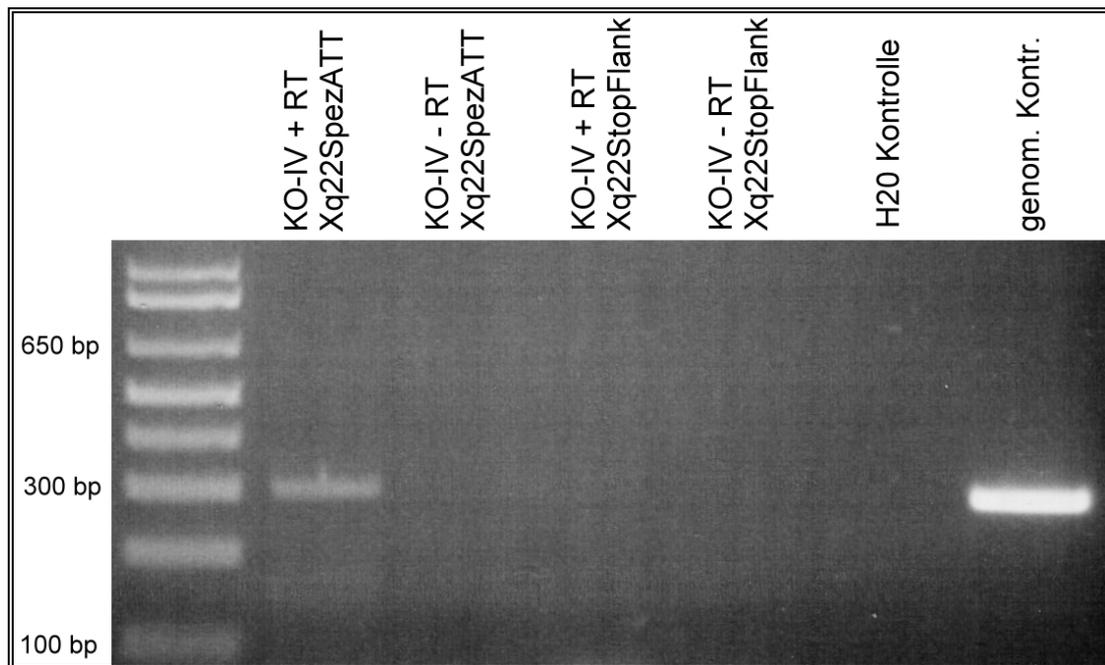


Abbildung 19: Ergebnis der PCR auf die Produkte der Gen – spezifischen Reversen Transkription für *HERV-W-env* Xq22.3. Anschließend an die für das *HERV-W* Provirus auf Chromosom Xq22.3 spezifische Reverse Transkription von RNA der Kontrollprobe KO-IV mit jeweils entweder nur dem Sense Primer (Xq22StopFlank) bzw. nur dem Antisense Primer (Xq22SpezATT) wurden die so hergestellten cDNA Proben (= KO-IV + RT) und Negativ Kontrollen (= KO-IV – RT) einer PCR mit den gleichen, auch für die Reverse Transkription verwandten, Primern unterzogen. Zu sehen ist, dass nur in der mit dem Antisense Primer Xq22SpezATT versehenen Reversen Transkriptionsansatz das gesuchte *HERV-W* Xq22 Transkript amplifiziert werden konnte, nicht jedoch im Ansatz mit dem entsprechenden Sense-Primer (Xq22StopFlank). Dies läßt den Rückschluß zu, daß die amplifizierte mRNA in, für eine etwaige Translation, korrekter Orientierung vorgelegen haben muss.

dieser PCR. Bei der untersuchten Kontrollprobe KO-IV ließen sich ausschließlich in der mit dem Xq22SpezATT Primer hergestellten cDNA *HERV-W* Transkripte amplifizieren, womit gezeigt wurde, dass diese Transkripte aufgrund ihrer Orientierung tatsächlich für die Translation eines *HERV-W-Env* Proteins dienen könnten. Die amplifizierte cDNA wurde anschließend kloniert und vier Klone (ATT+RT-K1 – K4) sequenziert um sicher zu stellen, dass es sich bei der amplifizierten Bande um das Provirus von Chromosom Xq22.3 handelt. Alle vier Klone zeigten eine 100 prozentige Übereinstimmung mit dem Xq22.3 Locus. Um dieses Resultat zu bestätigen, wurde eine genspezifische Reverse Transkription einer weiteren Probe (KO-2) durchgeführt, die zeigte, dass auch hier Transkripte der *HERV-W* Kopie Xq22.3 in der, für die Proteinsynthese korrekter Orientierung vorliegen (Daten nicht gezeigt). Es ist somit davon auszugehen, dass von diesem, theoretisch für ein 53 Kilodalton großes und 475 Aminosäuren umfassendes Protein kodierenden, *HERV-W-env* Gen in

PBMC's regelhaft mRNA Transkripte in, für eine Proteinsynthese geeigneter Orientierung hergestellt werden. Das eröffnet die Möglichkeit, dass dieses provirale Gen physiologischerweise oder aber nach einer, im Rahmen von Pathomechanismen zustandekommenden, Aktivierung ein Protein exprimiert. Dieses Protein wäre allerdings im Gegensatz zu dem vom Klon AF331500 codierten MSRV-*env* Protein, welches 542 Aminosäuren lang und rechnerisch 60,6 Kilodalton schwer ist, um 67 N-terminale Aminosäuren verkürzt. Außerdem unterscheiden sich die beiden Proteine im Bereich der TM-Domäne, da die AF331500 Sequenz in diesem Abschnitt durch eine Rekombination auf ein Provirus auf Chromosom 5p12 zurückzuführen ist. Abbildung 20 zeigt ein multiples Alignment der Aminosäuresequenz der beiden Proteine.

AF331500	1	MALPYHTFLFTVLLPPFALT	APPPCCCTTSSSPYQEFLLWRTRLPGNIDAPSYRSLSKGNS
Xq22	1I.....X.....
AF331500	61	TFTAHTHMPRNCYNSATLCMHANTHYWTGKMINPSCPGGLGATVCWTYFTHTSMSDGGGI	
Xq22	61I.....
AF331500	121	QGQAREKQVKEAISQLTRGHSTPSPYKGLVLSKLNHETLRTHTRLVSLFNTTLTRLHEVSA	
Xq22	121
AF331500	181	QNPTNCWMCLPLHFRPYISIPVPEQWNNFSTEINTTSLVVGPLVSNLEIHTSNLTCVKF	
Xq22	181
AF331500	241	SNTIDTSSQCIRWVTPPTRIVCLPSGIFVCGTSAYHCLNGSSESMCFLSFLVPPMTIY	
Xq22	241
AF331500	301	TEQDLYNHVVPKPHNKRVPILPFVIRAGVLGRLGTGIGSITTSTQFYKLSQEINGDMEQ	
Xq22	301
AF331500	361	VTDSLVTLQDQLNSLAAVLQNRALDLLTAKRGGTCLFLGEERCYYVNQSRIVTEKVKE	
Xq22	361C.....
AF331500	421	IRDRIQCRAEELQNTERWGLLSQWMPWTLPLFLGPLAIIIFLLLFGPCIFNFLVKFVSSRI	
Xq22	421E.....V.....L.....L.....
AF331500	481	EAVKLQIVLQMEPQMOSMTKIYRGPLDRPARLCSVDNDIEVTPPEEISTAQPLLHSNSVG	
Xq22	481V.....H.....Q.....SE.....KG.....PCPI.....A.....
AF331500	541	SSX	
Xq22	541	..X	

Abbildung 20: Alignment der Aminosäuresequenz des von der Sequenz AF331500 codierten mutmaßlichen MSRV-Env Proteins und des vom ORF auf Chromosom Xq22 codierten HERV-W-Env Proteins. An Position 39 der Xq22 Sequenz befindet sich das Stop-Codon (rot). Dieses würde zu einer N-terminalen Trunkierung des Proteins führen wovon auch das Signalpeptid (gelb) betroffen wäre. Der offene Leserahmen auf Chromosom Xq22 beginnt somit frühestens mit dem Methionin an Position 68 (grau). Bis zu der Aminosäure an Position 403 (E) sind die beiden Proteine identisch. Im Bereich der TM Domäne finden sich 19 abweichende Aminosäuren (grün) da die AF331500 Sequenz in diesem Bereich von einem Provirus auf Chromosom 5p12 abstammt (siehe Abb. 14).

6.4 Screening auf Mutation im Stop-Codon des HERV-W-*env* Xq22.3 Locus

Es konnte gezeigt werden, dass der HERV-W Klon auf Chromosom Xq22.3 transkriptionsaktiv ist, die Transkripte in, für eine etwaige Translation, korrekter Orientierung vorliegen und abgesehen von einem Stopcodon im Signalpeptid weitgehend identisch mit der als MSR-V-*env* beschriebenen Sequenz AF331500 sind. Somit stellte sich die Frage ob sich in unserem Patienten- oder Kontrollkollektiv Personen mit einer Mutation in genau diesem Stop-Codon finden ließen. Wäre dies der Fall, so bestünde die Möglichkeit, dass es Personen gibt, bei denen das HERV-W Provirus auf Chromosom Xq22.3 ein Env-Protein mit intaktem Signalpeptid kodiert, welches in seiner Struktur zu MSR-V-Env fast identisch ist. Im Folgenden wurde daher die gDNA von 10 Patienten und 10 Kontrollen hinsichtlich einer Mutation im HERV-W-*env* Gen auf Chromosom Xq22.3 untersucht (Zur Methode siehe Kap. 3.9.2). Abbildung 21 und 22 zeigen die multiplen Alignments der Klone von Patienten und Kontrollen im entsprechenden, das Stop-Codon enthaltenden Bereich der Sequenzen.

Der Klon MS-4-K2 besaß eine Mutation im Stop Codon, welche jedoch nicht identisch mit der Mutation der Sequenz AF331500 ist. Anstatt eines TGG (=Tryptophan) wie bei der MSR-V Sequenz AF331500 findet sich in dieser Sequenz „CGA“ was für Arginin codiert.

Xq22- <i>env</i>	1	GCTGCTGTACAACCAAGTAGCTCCCCCTTACCAAGAGTTTCTATGAAGAACGGGCTT-CCT
MSRV- <i>env</i>	1G.....
MS-1-K2	1-.....
MS-1-K7	1-.....
MS-1-K17	1-.....
MS-1-K19	1-.....
MS-2-K1	1-.....
MS-2-K2	1-.....
MS-3-K1	1-.....
MS-3-K2	1-.....
MS-3-K3	1-.....
MS-3-K4	1-.....
MS-3-K5	1C.....
MS-3-K6	1-.....
MS-3-K7	1-.....
MS-3-K8	1-.....
MS-4-K1	1-.....
MS-4-K2	1C.....
MS-4-K3	1-.....
MS-4-K4	1-.....
MS-4-K5	1-.....
MS-4-K7	1C.....
MS-4b-K1	1-.....
MS-4b-K2	1-.....
MS-4b-K3	1-.....

Xq22-env	1	GCTGCTGTACAACCAGTAGCTCCCTTACCAAGAGTTTCTATGAAGAACGGGCTTCCTG
MSRV-env	1C.....
KO-1-K1	1
KO-1-K2	1
KO-1-K3	1
KO-1-K4	1
KO-1-K5	1
KO-1-K6	1
KO-1-K8	1
KO-2-K1	1
KO-2-K2	1
KO-3-K1	1
KO-3-K2	1
KO-4-K1	1
KO-4-K2	1
KO-4-K3	1
KO-4-K4	1
KO-4-K5	1
KO-4-K6	1
KO-4-K7	1
KO-5-K1	1
KO-5-K3	1
KO-5-K4	1
KO-5-K7	1
KO-5-K9	1
KO-6-K1	1
KO-6-K2	1
KO-6-K3	1
KO-6-K6	1
KO-6-K7	1
KO-6-K8	1
KO-7-K1	1
KO-7-K3	1
KO-7-K4	1
KO-7-K5	1
KO-7-K6	1
KO-7-K7	1
KO-8-K1	1
KO-8-K3	1
KO-8-K4	1
KO-8-K6	1
KO-8-K7	1C...G.T..A.....CA
KO-9-K1	1
KO-9-K2	1
KO-9-K3	1
KO-9-K4	1
KO-9-K7	1
KO-10-K2	1
KO-10-K3	1

Abbildung 22: Multiple Alignment des Stop Codon enthaltenden Bereichs der HERV-W-env Loci auf Chromosom Xq22.3 bei 10 Kontrollen. **Gelb:** Stop Codon; **Rot:** darin gefundene Mutationen. Die zweite Zeile gibt die MSRV-env Sequenz AF331500 wieder. Zu erkennen ist, dass an Position 44 ein C anstatt eines T zu finden ist, was aus dem Stop Codon („TGA“) ein Tryptophan-Codon („TGG“) macht. Der Klon KO-8-K7 besitzt eine identische Mutation, welche allerdings von einer Rekombination mit dem HERV-W Provirus auf Chromosom 5q11.2 herrührt (siehe auch Abbildung 15 Klon MS-4-K23, Alignment nicht abgebildet).

Zur Kontrolle wurde der Klon nochmals retrograd sequenziert (MS-4-K7), was die Mutation bestätigte. Ein Versuch bei diesem Patienten diese Mutation durch Sequenzierung von 16 weiteren Klonen (MS-4b-K1 bis MS-4b-K16) ein zweites mal nachweisen zu können scheiterte. Eine der Sequenzen (MS-4-K16) wies eine zu AF331500 synonyme Mutation auf, welche sich jedoch durch einer Rekombination mit einem HERV-W Provirus auf Chromosom 5q11.2 erklären ließ (Alignment nicht abgebildet). Auch einer der Klone von Kontrollen (KO-8-K7) zeigte eine genau identische Rekombination.

6.5 Identifikation eines neuen single nucleotide polymorphism (=SNP) im HERV-W-*env* Xq22.3 Locus

Bei der Suche nach dem Vorliegen einer Punktmutation im Stopcodon des HERV-W-*env* Locus auf Chromosom Xq22 (siehe Kap. 6.4) fiel in den für die Analyse der Sequenzen erstellten Alignments bei einigen Proben ein SNP an Position 157 auf. 5 von 10 Kontrollen wiesen an dieser Stelle ein Thymin anstatt eines Cytosins auf, während nur ein Patient diese Mutation besitzt. Die Mutation ist nicht synonym und codiert für Isoleucin („ATT“) anstatt des normalerweise an dieser Stelle stehenden Threonins („ACT“). Die MSRV-Sequenz weist diesen SNP nicht auf. Abbildung 23 zeigt ein multiples Alignment aller Sequenzen von Proben, welche diesen SNP aufweisen. Da das Provirus auf dem X Chromosom liegt, kommt es im Genom von Männern nur in einfacher Kopie vor während Frauen, welche zwei X Chromosomen besitzen, für den neuen SNP heterozygot oder homozygot sein können, je nachdem, ob nur eines oder beide Chromosomen den SNP tragen. Fünf der sechs Personen welche diesen SNP aufweisen sind heterozygot, das heißt es wurden bei ihnen Klone mit und solche ohne den SNP gefunden. Eine Kontrolle (KO-6) ist für diesen SNP jedoch homozygot (sechs von sechs Sequenzen dieser Person weisen den SNP auf, damit ist die Wahrscheinlichkeit eine Heterozygotie dieser Probe übersehen zu haben $p = 0,016$). Die Wahrscheinlichkeit bei einer der Proben von weiblichen Probanden den SNP übersehen zu haben, liegt bei der Analyse von sechs Sequenzen $< 1,6 \%$, bei nur fünf Sequenzen $< 3,1 \%$ unter der Voraussetzung, dass die Herkunft der klonierten Sequenzen zufällig auf die beiden X Chromosomen verteilt ist.

Xq22-env	121	ACACCCATATGCCCCGCAACTGCTATAACTCTGCC ACT CTTTGCATGCATGCAAATACTC
MSRV-env	121
KO-1-K1	121
KO-1-K2	121
KO-1-K3	121
KO-1-K4	121T.....
KO-1-K5	121T.....
KO-1-K6	121
KO-1-K8	121T.....
KO-4-K1	121T.....
KO-4-K2	121T.....
KO-4-K3	121
KO-4-K4	121
KO-4-K5	121
KO-4-K6	121T.....
KO-4-K7	121
KO-5-K1	121
KO-5-K3	121T.....
KO-5-K4	121T.....
KO-5-K7	121T.....
KO-5-K9	121
KO-6-K1	121T.....
KO-6-K2	121T.....
KO-6-K3	121T.....
KO-6-K6	121T.....
KO-6-K7	121T.....
KO-6-K8	121T.....
KO-7-K1	121
KO-7-K3	121
KO-7-K4	121T.....
KO-7-K5	121T.....
KO-7-K6	121
KO-7-K7	121T...C.....
MS-3-K1	121
MS-3-K2	121T.....
MS-3-K3	121
MS-3-K4	121
MS-3-K5	121
MS-3-K6	121
MS-3-K7	121
MS-3-K8	121T.....

Abbildung 23: Multiples Alignment der Sequenzen aller Proben, welche einen nicht-synonymen SNP im HERV-W-env Gen auf Chromosom Xq22 aufweisen (in diesen Sequenzen an Position 157). Zu erkennen ist, dass die MSRV Sequenz (zweite Zeile) diesen SNP nicht besitzt. Fünf von 10 Kontrollen zeigen diesen SNP, eine davon homozygot (KO-6). Nur eine der MS Proben ist für den SNP positiv. Das Leseraster des Offenen Leserahmens innerhalb des env Gens ist durch das **Grau** hinterlegte Basentriplet („ACT“) der Referenzsequenz markiert.

In Tabelle 15 ist eine Übersicht über die Häufigkeit des SNP's in beiden Gruppen zu sehen. Aufgrund der kleinen Stichprobenanzahl ist das Ergebnis knapp nicht signifikant (Fisher's Exact Test $p = 0,07$)

	C / C	C / T	T / T
Kontrollen	5	4	1
Patienten	9	1	0

Tabelle 15: Übersicht über die Anzahl der Sequenzen im Kontroll und Patientenkollektiv, welche den neu beschriebenen SNP im *HERV-W-env* Gen auf Chromosom Xq22 aufweisen. Von beiden Gruppen wurden zehn Proben analysiert, fünf der zehn Kontrollen weisen die nicht synonyme Mutation auf, während nur eine der Patientenproben die Mutation besitzt. Eine der Kontrollen war homozygot für den SNP. Berücksichtigt man nur das Merkmal SNP ja/nein so ergibt der Fisher's Exact Test einen knapp nicht signifikanten P-Wert von $p = 0,07$.

7 Diskussion

Es gibt mehr als 100 HERV-W Loci im humanen Genom. Davon besitzen 13 Loci ein Voll-längen *env* Gen. In Rahmen dieser Arbeit sollten HERV-W-*env* Loci in PBMC's von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen hinsichtlich ihrer Transkriptionsaktivität untersucht werden. Damit sollte eine Aussage ermöglicht werden, welche der ausgewählten HERV-W-*env* Loci transkriptionsaktiv sind (Kap.6.1.2), ob diesbezüglich ein Unterschied zwischen Patienten mit MS und Kontrollen besteht (Kap. 6.1.5) und ob Transkripte eines, möglicherweise exogenen MSR/V nachgewiesen werden können. Anschließend sind die in der Literatur beschriebenen MSR/V Sequenzen (Perron et al., 1997 / Komurian-Pradel et al., 1999) unter Berücksichtigung der gesammelten Erkenntnisse über die Häufigkeit von *in-vitro* Rekombinationsereignissen bei der RT-PCR, bezüglich ihrer Herkunft analysiert worden (Kap. 6.2). Abschließend wurde die Orientierung der Transkripte des HERV-W Locus auf Chromosom Xq22.3, welcher einen größeren offenen Leserahmen besitzt, bestimmt (Kap. 6.3) und eine Gruppe von 10 Patienten und zehn Kontrollen hinsichtlich einer Punktmutation innerhalb dieses HERV-W Locus untersucht (Kap. 6.4).

In der Vergangenheit sind eine Reihe von Studien durchgeführt worden um das Vorhandensein von MSR/V / HERV-W mRNA Transkripten im Serum, Liquor und anderen Geweben von Patienten mit MS und Kontrollen zu untersuchen. Meist wurden die Transkripte dabei jedoch nur mittels konventioneller PCR, ohne anschließende Sequenzierung der amplifizierten cDNA, nachgewiesen (Garson et al., 1998 / Serra et al., 2001 / Dolei et al., 2002 / Sotgiu et al., 2002 / Nowak et al., 2003 / Mameli et al., 2007). Die angewandten Methoden erlaubten somit keine definitive Aussage darüber, ob MSR/V oder aber HERV-W Transkripte detektiert wurden und welche Proviren bzw. Sequenzen für die beobachtete MSR/V / HERV-W mRNA Expression in den Patientenkollektiven verantwortlich waren. Des Weiteren basierten die verwandten PCR-Primer auf den einschlägigen, in der Literatur beschriebenen, mutmaßlichen MSR/V Sequenzen. Die in allen erwähnten Studien (mit Ausnahme von Nowak et al.), verwandten Oligonukleotide erkennen neben der von Perron 1997 veröffentlichten MSR/V-*pol* Sequenz, AF009668, auch ein auf Chromosom 6q27 gelegenes HERV-W Provirus (Siehe Kap.6.2.3). Daraus wird ersichtlich, dass der Information, ob und welche HERV-W Proviren transkriptionsaktiv sind, wie diese im Verhältnis zu MSR/V stehen und woher die beschriebenen MSR/V Sequenzen stammen, eine große Bedeutung für die Interpretation der bisher gesammelten Erkenntnisse bezüglich MSR/V beizumessen ist.

7.1 In humanen PBMC's transkribierte HERV-W-*env* Loci

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mindestens sieben HERV-W-*env* Loci in humanen PBMC's transkribiert werden. Alle, als transkriptionsaktiv ermittelten, HERV-W Proviren stellen sowohl bei Personen mit MS als auch bei den Kontrollen mRNA Transkripte her und keiner der transkribierten Loci war spezifisch nur im Patientenkollektiv aktiv. Eine, im Rahmen der Multiplen Sklerose auftretende, selektive Aktivierung der Transkription eines der nachgewiesenen, endogenen HERV-W Proviren in PBMC's ist somit sehr unwahrscheinlich. Vier Proviren, welche laut Blat PCR von den verwandten Primern ebenfalls erfasst werden müssten (die auf Chromosom 11p14.3, 12q13.13, 1p32.3 sowie 5q21.3 gelegenen HERV-W-*env* Loci), wurden nicht nachgewiesen und sind somit höchstwahrscheinlich in PBMC's nicht transkriptionsaktiv (Siehe Kap. 6.1.2). Mit absoluter Sicherheit lässt sich eine Aussage darüber jedoch nicht treffen, da sehr seltene Transkripte möglicherweise nicht unter den sequenzierten Klonen vertreten waren.

Die von uns getroffenen Aussagen über Häufigkeit der Transkripte eines bestimmten Provirus beruhen auf den in Kap. 6.1.5 gemachten Annahmen. Dazu zählt unter anderem die gleichmäßigen Amplifikation aller erfassten HERV-W Loci, die rein zufälligen Integration der amplifizierten Sequenzen in die zur Klonierung verwandten Plasmide sowie die stochastischen Auswahl von Klonen zur anschließenden Sequenzierung. Eine mögliche Fehlerquelle liegt in einer stärkeren bzw. schwächeren Amplifikation bestimmter Sequenzen während der PCR aufgrund von Längenunterschieden oder unterschiedlichen Primerbindungseigenschaften. So wäre beispielsweise zu erwarten, dass Sequenzen, welche in einem der beiden Primer, insbesondere am 3' Ende des Primers, welches für die Bindung die wichtigste Rolle spielt, abweichende Nukleotide aufweisen mit geringerer Effizienz amplifiziert werden, als Sequenzen, welche mit beiden Primern exakt übereinstimmen. Somit ist davon auszugehen, dass die cDNA des HERV-W Locus auf Chromosom 15q21.3, welcher ein Mismatch zu dem verwandten Forward Primer MS/Herv-U aufweist, unter Umständen mit geringerer Effizienz amplifiziert wurde, als z.B. die von Chromosom 6q21. Dies würde die Ergebnisse bezüglich der prozentualen Anteile der einzelnen Transkripte verzerren. So lässt sich spekulieren, dass das am häufigsten auftretende Provirus auf Chromosom 15q21.3 *in vivo* einen noch größeren Anteil der erfassten mRNA Transkripte stellt.

Eine andere mögliche Fehlerquelle wäre die bevorzugte oder erschwerte Ligation in die Plasmide aufgrund von Längenunterschieden, was für die vorliegende Untersuchung aber nahezu ausgeschlossen werden kann, da alle amplifizierte Fragmente eine fast identische Länge aufweisen (625 bis 641 bp).

Wie bereits angesprochen muss außerdem davon ausgegangen werden, dass seltene Transkripte, welche *in-vivo* einen sehr geringen Anteil der erfassten HERV-W mRNA's ausmachen, aus stochastischen Gründen eventuell nicht unter unseren 332 sequenzierten Klonen vertreten sind.

7.1.1 Struktur der transkribierten HERV-W Loci

In einer 2002 veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass 26,9 % aller HERV-W Proviren im humanen Genom die Struktur prozessierter Pseudogene aufweisen (Pavlíček et al., 2002). Betrachtet man jedoch nur Elemente mit internen Sequenzen, also erhaltenen *gag*, *pol* oder *env* Regionen im Gegensatz zu reinen Solo – LTR's, so machen prozessierte Pseudogene sogar 52,5 % dieser HERV-W Elemente aus. In allen anderen HERV Familien sind prozessierte Pseudogene indessen nur sehr selten anzutreffen (Pavlíček et al., 2002). Prozessierte Pseudogene innerhalb der HERV-W Familie sind am 5' LTR trunkiert und besitzen teilweise einen von gespleißter, retroviraler mRNA abgeleiteten Aufbau sowie einen Poly – A Schwanz. Sie sind an Insertionsstellen ins Genom integriert, welche von einer Retrotransposition durch LINE Elemente zeugen. Im Gegensatz zu einer, durch die retrovirale Reverse Transkriptase bewerkstelligten, retroviralen Replikation, weisen im Zuge der reversen Transkription durch LINE Elemente entstandene prozessierte Pseudogene eine Trunkierung am 5' LTR auf. Damit fehlt diesen prozessierten HERV-W Pseudogenen die U3 Region des LTR, welche die virale Promotorsequenz enthält. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass diese HERV-W Kopien aufgrund des fehlenden Promotors nicht transkribiert werden und ihnen somit weder eine physiologische noch eine pathologische Rolle zukommen könne (Pavlíček et al., 2002 / Costas 2002).

Von Nellåker et al. konnte bereits gezeigt werden, dass auch HERV-W Loci ohne U3 Region transkribiert werden und sich sogar Transkripte von weiteren Loci komplett ohne erkennbaren 5' LTR nachweisen lassen. Damit war erstmals demonstriert, dass auch HERV-W Loci mit trunkierter U3-Region oder sogar ohne 5'-LTR transkriptionsaktiv sein können (Nellåker et al., 2006).

Unsere Daten weisen ebenfalls eindeutig darauf hin, dass auch HERV-W Pseudogene transkriptionsaktiv sind. Sechs der sieben in dieser Arbeit nachgewiesenen, transkriptionsaktiven HERV-W Loci weisen die Struktur prozessierter Pseudogene mit trunkierten oder deletierten LTR's auf. Nur das Provirus auf Chromosom 7q21.2, für welches bereits die Expression eines Proteins (Syncytin-1) *in-vivo* gezeigt wurde (Blond et al., 2000), weist die Struktur eines kompletten Retrovirus mit erhaltener U3 Region inklusive viralem Promotor auf. Für den Syncytin-1 kodierenden ERVWE1 Locus auf Chromosom 7q21.2 konnte gezeigt werden, dass zelluläre Enhancer außerhalb des viralen 5' LTR die Transkriptionsaktivität dieses Provirus beeinflussen können (Prudhomme et al., 2004). Analog dazu sind wahrscheinlich noch nicht identifizierte, alternative Promotoren für die Expression der, von uns als transkriptionsaktiv nachgewiesenen, HERV-W Pseudogene ohne intakten 5' LTR verantwortlich.

7.2 Herkunft rekombinierter Sequenzen

Bei der Analyse der Transkriptionsmuster der untersuchten HERV-W Proviren ließen sich 99 von insgesamt 332 sequenzierten cDNA's nicht eindeutig (d.h. mit >99,5 % übereinstimmenden Nukleotiden) einem bestimmten proviralen Locus im humanen Genom zuordnen. Diese, vorläufig nicht zuzuordnenden cDNA Transkripte stellen, untereinander verglichen, eine heterogene Gruppe von HERV-W Sequenzen dar, weshalb es als sehr unwahrscheinlich erscheint, dass es sich dabei um neue, bisher nicht beschriebene, im humanen Genom vorhandene HERV-W Proviren handelt. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass diese Sequenzen von einem neuen, replikationskompetenten HERV-W Provirus stammen oder durch *in-vivo* Rekombinationen in retroviralen Partikeln entstanden sind, welche von HERV-W kodiert sind. In diesem Fall wäre es zu erwarten, dass eine definierte cDNA Sequenz dieses neuen Provirus, genau wie die Transkripte bereits bekannter HERV-W Proviren, wiederholt beobachtet wird. Die nachgewiesenen, rekombinierten Sequenzen waren jedoch sehr unterschiedlich zueinander und es ließ sich keine definierte, rekombinierte Sequenz eines neuen Provirus abgrenzen.

Auch in anderen Arbeiten zur Expression von HERV's ist das Auftreten rekombinanter Sequenzen beschrieben worden. In einer Studie zur Expression von HERV-K(HML2) gelang es durch eine computergestützte Analyse der sequenzierten cDNA mittels des Programmes RECCO etwa 5 % rekombinierte Sequenzen identifizieren (Flockerzi et al., 2007). Dabei wurden in dieser Studie nur Sequenzen mit mehr als 18 Nukleotiden Abweichung zur ähn-

lichsten genomischen Referenzsequenz auf mögliche Rekombinationen untersucht. In dieser Arbeit machen die rekombinierten Sequenzen einen wesentlich größeren Anteil von ca 30 % der analysierten Klone aus. Dies erklärt sich dadurch, dass letztlich alle Sequenzen, d.h. auch solche mit nur einem Nukleotid Abweichung zur am besten passenden genomischen Sequenz, manuell auf mögliche Rekombinationsereignisse untersucht wurden (Siehe Kap. 5.4.1).

Bei zwei verschiedenen Schritten kann es bei der Anwendung der verwandten Methoden zu Rekombinationen kommen. Einerseits kann bei der Herstellung der cDNA die Reverse Transkriptase von der mRNA eines HERV-W Provirus auf die mRNA eines anderen HERV-W Provirus gesprungen sein (ein sog. „template switch“), wodurch eine Chimäre der beiden beteiligten Proviren entsteht. Andererseits können sich während der anschließenden PCR beim Annealing ein unvollständig synthetisierter DNA Einzelstrang eines Provirus mit dem unvollständigen DNA Einzelstrang eines anderen HERV-W Provirus aneinanderlagern und diese, mit dem jeweils anderen Strang als Matrize, zu Ende synthetisiert werden, was ebenfalls zu einer chimären DNA führen würde. Beide Mechanismen der *in-vitro* Rekombination, sowohl während der Reversen Transkription als auch während der PCR sind bekannte Phänomene (Luo & Taylor, 1990 / Meyerhans et al., 1990), wobei die von uns beobachteten Rekombinationen durch die Beteiligung eines oder beider Mechanismen entstanden sein können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bildung von *ex-vivo* Rekombinationen in vergleichbaren Studien unvermeidlich zu sein scheint. Daher müssen die Ergebnisse vergleichbarer Experimente hinsichtlich der Charakterisierung neuer retroviraler Sequenzen unter der Berücksichtigung solcher Artefakte äußerst vorsichtig interpretiert werden. Dies impliziert auch, dass es schwierig ist die Existenz einer infektiösen exogenen HERV Variante nur durch eine, auf einer RT-PCR basierenden Methode zu beweisen.

7.3 MSRV – exogenes Retrovirus oder Artefakt?

7.3.1 Implikationen der Ergebnisse für den Status von MSRV

Wie Anhand der erstellten Multiplen Alignments gezeigt wurde, lassen sich alle in der Literatur beschriebenen MSRV Sequenzen, zum Teil unter Annahme weniger Rekombinationsereignisse, auf endogene HERV-W Proviren zurückführen (siehe Kap. 6.2). Die MSRV-*env* Sequenz AF127227 geht bis auf eine Mutation auf ein HERV-W Locus auf Chromosom 3q23 zurück. Die MSRV-*env* Sequenz AF331500, welche als einzige der *env* – Sequenz ein

volllängen Protein kodiert, kann unter Annahme einer Rekombinationen bis auf vier verbleibende, unklare Nukleotide, auf endogene HERV-W Proviren von Chromosom Xq22.3 und 5p12 zurückgeführt werden. Nimmt man sogar vier Rekombinationsereignisse an, so verbleiben nur zwei nicht erklärbare Abweichungen von endogenen HERV-W Loci. Die MSRV-*env* Sequenz AF127228 stammt, bis auf vier nicht übereinstimmende Basenpaare auf einer Strecke von 1932 Nukleotiden, ebenfalls von der genomischen HERV-W Kopie auf Chromosom Xq22.3 ab. Nimmt man hier zwei Rekombinationsereignisse an, so lässt sich noch eine der vier Mutationen dadurch erklären. Die vierte MSRV-*env* Sequenz AF127229 kann unter Annahme einer Rekombination von zwei Proviren auf Chromosom 3p12.3 und 18q21.23 erklärt werden.

Die MSRV-*gag* Sequenz AF123881 stammt unzweifelhaft von dem HERV-W Locus auf Chromosom 3q26.32 von welchem bereits bekannt ist, dass er einen ORF für ein 363 Aminosäuren großes Gag Protein mit einer carboxy – terminal trunkierten Kapsid – Domäne besitzt (Voisset et al., 2000).

Auch bei der ersten dem MSRV – Genom zugeschriebenen Sequenz, MSRV-*pol* AF009668, kann nahezu mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass sie ebenfalls auf endogene HERV-W Sequenzen zurückgeht. Die Basenpaare 1 – 526 gehen zu annähernd 100% auf 1p34.2 zurück, das Ende der Sequenz ab Basenpaar 1737 stimmt fast vollständig mit einem HERV-W Provirus auf Chromosom 3p12.3 überein und ein 575 Nukleotide umfassender, zwischen diesen beiden Teilen liegender Abschnitt der Sequenz läßt sich mit 98 % Übereinstimmung einem HERV-W Locus auf Chromosom 6q27 zuordnen (siehe Abb. 17). Aus den bereits dargelegten Gründen konnten die genauen Rekombinationsstellen für diese Sequenz jedoch nicht nachvollzogen werden (siehe Kap. 6.2.3).

Die Anzahl der verbleibenden, von der jeweiligen genomischen Sequenz abweichenden und nicht durch Rekombinationen erklärbaren Nukleotide liegt für die MSRV Sequenzen zwischen 1,02 und 2,46 pro 1000 Basenpaare. Dies entspricht dem Bereich der in der Literatur beschriebenen, durch die Taq bedingten, normalen Fehlerrate des PCR-Verfahrens, welche mit 0,2 Basensubstitutionen / kb (Lundberg et al., 1991) bis zu 2,1 Basensubstitutionen / kb (Kheohavong and Thilly, 1989) angegeben wird. Außerdem können auch Basenaustausche bei der reversen Transkription sowie Sequenzierfehler zu den beobachteten abweichenden Nukleotiden beitragen. Von uns wurde, nach der Berücksichtigung von Rekombinations-

ereignissen, eine Fehlerrate von 1,54 Basensubstitutionen pro Kilobase beobachtet. Dies entspricht beispielsweise 2,97 Nukleotidaustauschen in einem PCR-Produkt von 1932 bp Länge wie der MSRV Sequenz AF127228.

Der Anteil der, im Rahmen dieser Arbeit beobachteten, rekombinierter Sequenzen betrug etwa 30 % aller sequenzierten Klone. Dies verdeutlicht, dass das Auftreten von Rekombinationen kein zu vernachlässigenden Randeffekt, sondern ein häufiges Vorkommnis im Rahmen einer RT-PCR von HERV – Sequenzen darstellt. Die von uns analysierten MSRV Sequenzen lassen sich, bis auf wenige Mutationen, mit endogenen, im humanen Genom vorhandenen, HERV-W Proviren erklären. Die Anzahl der nicht durch Rekombinationen erklärbaren Nukleotide liegt im Rahmen der bei Anwendung der Methode zu erwartenden Fehlerrate. Von dem, maßgeblich an den MSRV-env Sequenzen AF127227, AF127228 und AF331500 beteiligten HERV-W Provirus auf Chromosom Xq22.3 konnte im Rahmen unserer Transkriptionsmusteruntersuchung gezeigt werden, dass es regelmäßig sowohl bei Patienten mit MS als auch bei gesunden Kontrollen mRNA Transkripte herstellt. Von einigen der verbleibenden HERV-W Loci, welche an den MSRV Sequenzen beteiligt sind, ist nicht bekannt ob sie transkriptionsaktiv sind. In der vorliegenden Untersuchung konnte keine Aussage über deren Transkriptionsaktivität getroffen werden, da sie von dem verwandten Primerpaar nicht erfasst waren. Angesichts der Tatsache, dass allein im Rahmen dieser Arbeit in PBMC's sieben HERV-W-env Loci als transkriptionsaktiv herausgestellt haben, ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass auch die anderen, an den MSRV – Sequenzen beteiligten HERV-W Loci transkriptionsaktiv sind. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ist die wahrscheinlichste Erklärung für die bisher als MSRV bezeichneten Sequenzen deren Herkunft von Transkripten verschiedener endogener HERV-W Loci. Dies bedeutet, dass es sich bei den bisher als MSRV – Genom beschriebenen Sequenzen um, am ehesten um HERV-W Transkripte bzw. während der cDNA Synthese bzw. der anschließenden PCR Amplifikation entstandene, *ex-vivo* Rekombinationen von Transkripten endogener HERV-W Loci handelt. Diese Hypothese wird auch von den zuvor gemachten Beobachtungen zur Häufigkeit von Rekombinationsereignissen unterstützt (Flockerzi et al., 2007).

7.3.2 Alternative Erklärungsansätze für rekombinierte MSRV Sequenzen

Eine alternative Erklärung für die hier gemachten Beobachtungen wäre, dass die MSRV Sequenzen aus *in-vivo* Rekombinationen zwischen verschiedenen HERV-W Loci hervorgegangen sind, welche anschließend stabil in die genomische DNA der untersuchten Patienten integriert worden sind. Würden diese neuen, rekombinierten und integrierten HERV-W Provi- ren Transkripte produzieren, so könnten diese theoretisch der Ursprung der als MSRV beschriebenen, rekombinierten mRNA Transkripte sein (Perron et al., 1997 / Komurian-Pradel et al., 1999). Auch wenn sich diese mögliche Erklärung nicht grundsätzlich ausschließen läßt, sprechen mehrere Argumente gegen diese Hypothese. Zum einen sind die MSRV Sequenzen nicht identisch, wie man es von einem definierten, neu integrierten Virus erwarten würde. Die vier bekannten MSRV-*env* Sequenzen stammen z.B. von unterschiedlichen endogenen HERV-W Loci ab. Außerdem weisen die MSRV Sequenzen auch keine identischen Rekombination auf. Des Weiteren besitzen nicht alle MSRV Sequenzen einen offenen Lese- rahmen sondern sind zum Teil von Stop – Codonen unterbrochen was gegen eine mögliche Rolle als Genom eines replikationskompetenten Retrovirus spricht. Ebenfalls gegen die Theorie eines neuen, nur bei Patienten mit MS vorkommenden Retrovirus spricht die Tatsache, dass zumindest eine der Sequenzen (AF127228) nicht von einer an MS erkrankten Person stammt (Perron et al., 2001).

7.3.3 Bisherige Charakterisierung von MSRV

Angesichts der Tatsache, dass es sich bei den MSRV Sequenzen nach unseren Erkenntnissen nicht um das Genom eines exogenen, replikationskompetenten Retrovirus handelt, stellt sich die Frage wie die bisherigen Studien zu MSRV vor diesem Hintergrund interpretiert werden können. Daher sollen im Folgenden die, bei den bisherigen Untersuchungen bezüglich MSRV angewandten Methoden kurz kritisch bewertet werden.

7.3.3.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von retrovirusartigen Partikeln in Zellkulturen von Patienten mit MS

Zahllose Erkrankungen wie zum Beispiel das Sjögren Syndrom, Psoriasis, Systemischer Lupus erythematodes, Rheumatoide Arthritis, Mammatumore, Maligne Melanome, Hodentumore und eben auch die Multiple Sklerose sind in der Vergangenheit auf der Basis von elekt-

ronenmikroskopischen Aufnahmen mit Retroviren in Verbindung gebracht worden. Auch die Entdeckung der später als MSRV bezeichneten Partikel baut, neben der Detektion einer Reverse – Transkriptase Aktivität in Zellkulturen, hauptsächlich auf dieser Methode auf (Perron et al., 1989, 1991, 1992). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Elektronenmikroskopie auch anfällig für eine Reihe von Artefakten ist. Die Wahrscheinlichkeit seltene Partikel zu beobachten ist proportional zu der, bei der Betrachtung der Proben investierten Zeit und eine Aussage über die spezifische Expression der Virione bei Patienten nur zulässig, wenn die Proben sowohl von Patienten als auch Kontrollen mit der gleichen Aufmerksamkeit untersucht wurden. Des Weiteren können verschiedene zelluläre Komponenten, wie zum Beispiel Membranvorstülpungen von 100 nm Durchmesser, als retrovirale Partikel verkannt werden, wenn sie im Querschnitt getroffen wurden. Auf der anderen Seite kann eine latente Infektion bei der es nicht zur Partikelproduktion kommt, mit dieser Methode nicht erkannt werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von retroviralen Partikeln, welche mit, gegen das mutmaßliche Virus gerichteten, goldmarkierten Gag bzw. Env – Antikörpern markierte wurden, sind ein bedeutender Schritt um die Existenz und Identität eines neuen Virus zu bestätigen. Im Falle von MSRV liegen bislang keine Studien vor, bei denen versucht wurde die retroviralen Partikel auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit, gegen die mutmaßlichen MSRV Proteine gerichteten, Antikörpern zu markieren. Es wurde also bisher nicht gezeigt, dass die beschriebenen MSRV – Partikel auch tatsächlich von den assoziierten MSRV – Sequenzen kodiert werden.

7.3.3.2 Reverse – Transkriptase Aktivität im Zellkulturüberstand von Patienten mit MS

Ein weiteres Argument dafür, dass es sich bei den beobachteten Partikeln tatsächlich um Retroviren handelt, war, dass in, mittels Saccharose – Dichtegradient bzw. Ultrazentrifugation aufgereinigten, Viruspräparationen eine Reverse Transkriptase – Aktivität nachgewiesen werden konnte (Perron et al., 1989, 1991, 1992). Die angewandten Methoden der Virusanreicherung sollen theoretisch eine Kontamination mit RNA, DNA und anderem zellulärem Material verhindern. Es ist jedoch nicht klar ob diese Annahme korrekt ist, da zu dem Material, welches im Dichtegradienten in der Fraktion von 1,16 bis 1,18 g/ml wandert, auch Polyribosomen, mikrosomale Vesikel und andere zelluläre Komponenten gehören (Voisset et al., 2008).

Da es mehrere mögliche intrazelluläre Quellen einer Reverse – Transkriptase – Aktivität, wie zum Beispiel non – LTR Retrotransposons, Telomerasen und eben auch HERV's gibt, ist der Nachweis einer RT – Aktivität in derartig untersuchten Proben formal gesehen nicht für das Vorhandensein eines Retrovirus beweisend. Umgekehrt kann von der Abwesenheit einer solchen RT – Aktivität nicht auf die Abwesenheit von Retroviren in den Proben geschlossen werden, da diese in einer latenten, proviralen Form vorliegen können.

7.3.3.3 Übertragung eines mutmaßlichen infektiösen Agens durch Kokultur zweier leptomeningealer Zelllinien

Die erfolgreiche Virusproduktion in einer Zellkultur kann ein Indiz dafür sein, dass man es tatsächlich mit einem infektiösen, sich replizierenden Agens zu tun hat, wobei die Möglichkeit der Kontamination humaner Zellkulturen mit Retroviren tierischer Herkunft berücksichtigt werden muss. Bisher wurde lediglich die Übertragung einer MSR – Partikelproduktion von einer leptomeningealen Zelllinie (LM7) auf eine weitere Zelllinie gleicher Herkunft (LM11) durch Kokultur beschrieben (Perron et al., 1992). Zum damaligen Zeitpunkt waren allerdings noch keine mutmaßlichen MSR – Sequenzen kloniert und die Infektion konnte somit nicht mittels PCR bestätigt werden. Diese Bestätigung einer Infektion durch eine, für das virale Genom spezifische PCR wäre bei der Übertragung der Partikel auf eine Zelllinie die normalerweise HERV-W negativ ist, ein sicheres Indiz für die infektiöse Natur von MSR. Die Übertragung der Partikelproduktion auf eine Zelllinie identischer Herkunft durch Kokultur, wie von Perron beschrieben, ließe sich z.B. auch durch die Aktivierung einer Partikelproduktion z.B. durch Übertragung von Zytokinen erklären.

7.3.3.4 Amplifikation mutmaßlich partikelassoziierter RNA mittels RT-PCR und degenerierten Primern

Eine Schwierigkeit beim Nachweis neuer retroviraler Sequenzen mittels der RT-PCR ist es, eine Amplifikation von HERV Transkripten auszuschließen. Dies gilt insbesondere bei der Verwendung degenerierter Primer, d.h. von Primern die konservierten Abschnitte im Genom unterschiedlicher Viren erfassenden. Eben solche Primer kamen auch bei der Amplifikation der mutmaßlichen MSR-*pol* Sequenz AF009668 durch Perron et al zum Einsatz (siehe Kap. 6.2.3, Perron et al., 1997). Eine Strategie um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, mittels degenerierter Primer die Transkripte exogener Viren zu amplifizieren, ist es eine PCR auf, mittels Dichtegradient, aufgereinigte Virione durchzuführen. So soll die in Virusparti-

keln enthaltene RNA physikalisch von gelöster RNA, welche auch Transkripte von HERV's enthält, getrennt werden. Die auch von Perron et al. angewandte Behandlung der Viruspräparation mit Nukleasen soll freie RNA und DNA zerstören, wobei die in Viruskapsiden enthaltene RNA geschützt ist (Perron et al. 1997 / Komurian-Pradel et al. 1999). Wie bereits erläutert (siehe Kap 7.3.3.2) ist allerdings unklar, ob diese Annahme zutreffend ist, da sich zelluläre Komponenten in der isolierten Dichtefraktion wieder finden können, welche möglicherweise zelluläre Nukleinsäuren inklusive HERV Transkripten vor dem Nukleaseverdau bewahren könnten. Somit ist auch bei diesem Versuchsaufbau nicht sicher gewährleistet, dass keine Transkripte endogener HERV's amplifiziert werden, insofern sie von den verwandten Primern erfasst werden.

7.3.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bisher MSR/V zugeschriebenen Sequenzen höchstwahrscheinlich HERV-W Transkripte bzw. *ex-vivo* entstandene Rekombinationen von Transkripten endogener HERV-W Proviren darstellen. Diese Theorie wird von den von uns und auch einer anderen Arbeitsgruppe (Flockerzi et al., 2007) gemachten Beobachtungen zur Häufigkeit von *in-vitro* Rekombinationen bei Anwendung des RT-PCR Verfahrens unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens sieben HERV-W Proviren in PBMC's transkriptionsaktiv sind, wovon eines, der HERV-W Locus auf Chromosom Xq22.3, für maßgebliche Teile der MSR/V-*env* Sequenzen verantwortlich ist.

Die bisherigen zu MSR/V gemachten Studien sind kohärent zu der Hypothese, dass die mutmaßlichen MSR/V Sequenzen nicht von einem exogenes Retrovirus stammen. Bislang liegt keine Studie vor, in welcher, mit Antikörpern, die mittels der mutmaßlichen MSR/V – Sequenzen generierten wurden, in einem Westernblot oder über Immunoelektronenmikroskopie gezeigt wurde, dass die MSR/V Partikel tatsächlich von den mit ihnen in Verbindung gebrachten Sequenzen kodiert sind. Außerdem wurde kein zusammenhängendes, ein infektiöses Retrovirus kodierendes, Genom von MSR/V kloniert und seine Infektiosität *in-vitro* nachgewiesen. All diese Faktoren sprechen dagegen, dass es sich bei der als MSR/V beschriebenen Entität um ein replikationskompetentes, exogenes Retrovirus handelt.

7.3.5 Eine analoge Situation – „melanoma associated endogenous retrovirus“

Eine mit MSRV / HERV-W vergleichbare Situation liegt höchstwahrscheinlich bei dem als „melanoma associated endogenous retrovirus“ (MERV) bezeichneten Retrovirus vor. In den Überständen von humanen Melanom – Zellkulturen wurde das Vorhandensein einer Reverse Transkriptase Aktivität beschrieben und elektronenmikroskopische Aufnahmen von retrovirusartigen Partikeln in den Überständen dieser Zellkulturen angefertigt (Muster et al., 2003). Eine Untersuchung mutmaßlich partikelassoziierter RNA mittels RT-PCR brachte Sequenzen mit hoher Homologie (> 93 %) zu HERV-K 108 und 113 hervor, die durch das Vorhandensein eines neuen, mit HERV-K verwandten, endogenen Retrovirus (MERV) erklärt wurden (Muster et al., 2003). In einer Folgestudie konnte allerdings gezeigt werden, dass die, aus Partikeln verschiedener Melanomzelllinien isolierten Sequenzen heterolog sind und sogar die Sequenzen aus Partikeln ein und derselben Zelllinie variierten (Hirschl et al., 2007). In Analogie zu der Situation bei MSRV könnte es sich auch bei den von Muster et al. charakterisierten MERV Sequenzen um *in-vitro* Rekombinationen von HERV-K Transkripten handeln, welche bei der Amplifikation endogener, partikelassoziierter HERV-K mRNA entstanden sind.

7.4 Konsequenzen für die mögliche Rolle von MSRV / HERV-W bei der Pathogenese der MS

Auch wenn nicht länger davon auszugehen ist, dass es sich bei MSRV um ein infektiöses, sich replizierendes Retrovirus handelt, so sind doch für HERV-W Proteine bereits funktionelle Effekte beschrieben welche im Zusammenhang mit der MS stehen könnten (Siehe Kap. 2.3.4).

7.4.1 Mögliche Translation von HERV-W-*env* Xq22.3 Transkripten

Perron et al. wiesen für ein, mittels der MSRV Sequenz AF331500 hergestelltes, Env Protein *in-vitro* die Fähigkeit zur polyklonalen Aktivierung humaner T-Zellen mit V β 16 T-Zell-Rezeptor im Sinne einer superantigenen Immunantwort nach (Perron et al., 2001). In einer weiteren Arbeit gelang es zu zeigen, dass die Surface Domäne von, mittels der Sequenz

AF331500 hergestelltem, MSRV-Env Protein Monozyten zur Produktion proinflammatorischer Zytokinen anregt (Rolland et al., 2006). Außerdem konnte mit dem rekombinanten Env Protein die Reifung von dendritischen Zellen ausgelöst und so die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th-1 Zellen unterstützt werden.

Vor diesem Hintergrund ist von großer Bedeutung, dass es sich nach den hier dargestellten Ergebnissen bei der Sequenz AF331500 um eine Rekombination zweier endogener HERV-W Loci handelt, wobei die ersten 1341 Nukleotide mit nur vier Ausnahmen von einem HERV-W Locus auf Chromosom Xq22.3 stammen. Unter den in dieser Arbeit als transkriptionsaktiv identifizierten HERV-W Loci besitzt ausgerechnet dieses Provirus, abgesehen von dem bereits bekannten Syncytin-1 – Gen auf Chromosom 7q21.2 (Blond et al., 2000), einen größeren offenen Leserahmen für ein 475 Aminosäuren großes HERV-W Envelope Protein (Siehe Kap. 6.3). Die Sequenz AF331500 weist gegenüber dem HERV-W Locus auf Chromosom Xq22.3 an Position 116 ein, unter Umständen von einer Rekombination mit dem Syncytin-1 Locus herrührendes, Guanin auf. Dadurch ist das im Xq22.3 Locus an dieser Stelle vorhandene Stop – Codon zu dem für Tryptophan kodierenden Basentriplet verändert. Vergleicht man die von AF331500 und dem ORF auf Chromosom Xq22.3 kodierten Proteine miteinander, so stellt sich heraus, dass beide in der funktionell relevanten Surface – Domäne identisch sind (siehe Abb. 15, Kap. 6.3). Das von HERV-W Xq22.3 kodierte Env Protein wäre gegenüber dem von AF331500 kodierten Envelope Protein N-terminal um 67 Aminosäuren verkürzt und besäße somit kein Signalpeptid. Auch in der Transmembran – Domäne des Xq22.3 Env Proteins finden sich gegenüber dem, 2001 von Perron et al. verwendeten, MSRV-Env 19 abweichende Aminosäuren, da die Sequenz AF331500 in diesem Bereich auf das HERV-W Provirus auf Chromosom 5p12 zurückgeht. Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass ein transkriptionsaktives HERV-W Provirus auf Chromosom Xq22.3 einen offenen Leserahmen aufweist, welcher für ein Envelope Protein kodieren könnte, das im Bereich der Surface Domäne komplett mit MSRV-Env übereinstimmt (siehe Abb. 20).

7.4.2 HERV-W-*env* Xq22.3 Transkripte erfüllen die Voraussetzungen für eine Translation

Vor dem beschriebenen Hintergrund haben wir die Orientierung der mRNA Transkripte von Chromosom Xq22.3 überprüft, um zu eruieren, ob diese unter geeigneten Bedingungen als Matrize zur Synthese des entsprechenden Envelope Proteins dienen können. Dies scheint in der Tat der Fall zu sein (Kap. 6.3). Die HERV-W Xq22.3 Transkripte besitzen als mögliche

alternative Translationsstartpunkte mehrere für Methionin kodierende Basentriplets „downstream“ des Stop – Codons, welches diesen ORF im Vergleich zur MSRV Sequenz AF331500 verkürzt (Siehe Abb. 15 Kap. 6.3). Eine Expression verkürzter HERV Envelope Proteine, ausgehend von internen Translationsstartpunkten ist z.B. für Syncytin-1 bereits beschrieben worden (de Parseval et al., 2003). Gegenwärtig wird von der Arbeitsgruppe Ruprecht überprüft, ob sich von dem HERV-W Xq22.3 Locus *in-vitro* Proteine produzieren lassen.

7.4.3 Immunhistochemische Hinweise auf eine Expression von HERV-W Xq22.3 env und HERV-W 3q26.32 gag

Mit der Erkenntnis, dass es sich bei MSRV um die Transkripte endogener HERV-W Kopien handelt, stellte sich die Frage, ob es bereits Daten zur Proteinexpression dieser, an den MSRV – Sequenzen beteiligten, HERV-W Proviren mit offenen Leserahmen gibt. Antony et al. untersuchten die Expression des von HERV-W 7q21.2 kodierten Syncytin-1 Proteins in Gehirnen von Patienten mit MS und Kontrollen, welche an anderen, nicht demyelinisierenden, neurologischen Erkrankungen litten (Antony et al., 2004). In den, mittels des monoklonalen Antikörpers 6A2B2 durchgeführten, immunhistochemischen Färbung zeigte sich eine starke Expression des Proteins in den akuten demyelinisierenden Läsionen der Patienten mit MS, nicht jedoch in den Gehirnen der Kontrollen. In den, als Mediatoren einer Inflammation bedeutenden, Astrozyten und der Mikroglia innerhalb der MS – Herde fand man eine selektiv verstärkte Expression des Proteins. Der, im Rahmen dieser Studie, verwandte monoklonale Antikörper wurde vormals von Blond et al. generiert (Blond et al., 2000). Aus dieser Arbeit wiederum geht hervor, dass der monoklonale Antikörper 6A2B2 mittels der MSRV – Sequenz AF127228 hergestellt wurde. Diese geht nach unseren Erkenntnissen jedoch eindeutig auf das HERV-W Provirus von Chromosom Xq22.3 und nicht auf den Syncytin-1 – Locus zurück. In einem durchgeführten Westernblot erkannte der Antikörper 6A2B2 *in-vitro* mittels der Sequenz AF331500 hergestelltes MSRV-Env Protein, nicht jedoch rekombinantes Syncytin-1 Env (Ruprecht et al., unveröffentlichte Daten, Manuskript in Vorbereitung). Zusammengefasst könnte dies bedeuten, dass von Antony et al. nicht die selektive Expression von Syncytin, sondern die von HERV-W Xq22.3 Envelope Protein in MS Läsionen nachgewiesen worden ist. Auch Mameli et al. fanden bei immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Antikörper 6A2B2 eine verstärkte Expression von HERV-W-Env in den aktiven Läsionen in Gehirnen von Patienten mit MS (Mameli et al., 2007). Unter diesem Aspekt ist

es umso interessanter, dass es sich hierbei um jenes Protein handelt, für welches bereits proinflammatorische Eigenschaften beschrieben worden sind (siehe Kap. 7.4.1, Perron et al., 2001 / Rolland et al., 2006).

Auch die von Perron et al. bei der Untersuchung zur Expression von HERV W Gag und Env Proteinen verwandten Antikörper sind mit MSR/V Proteinen generiert worden (Perron et al., 2005). Zur Herstellung der Anti – Env Antikörper war die, von HERV-W Xq22.3 und 5p12 stammende, Sequenz AF331500 verwandt worden. Die Sequenz AF127221, d.h. HERV-W 3q26.32, diente der Herstellung von Anti – Gag Antikörpern. Rückwirkend, unter Berücksichtigung unserer Erkenntnisse zu MSR/V betrachtet, wurde in dieser Studie unter Umständen die ausgeprägte Expression von HERV-W Xq22.3 Envelope Protein in Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen innerhalb der MS – Läsionen nachgewiesen. Die Axone innerhalb der demyelinisierenden Läsionen der Patienten mit MS ließen sich, mit den gegen die HERV-W 3q26.32 *gag* Sequenz gerichteten Antikörpern intensiv anfärben. In den Neuronen der Gehirne von Kontrollpersonen wurde ebenfalls eine Anfärbung mit diesem Antikörper, im Sinne einer physiologischen Expression, beobachtet (Perron et al., 2005).

7.4.4 Ausbleiben einer Immunantwort gegen MSR/V / HERV-W

Vor dem Hintergrund der beschriebenen, veränderten Expression von HERV-W Proteinen im Rahmen der Multiplen Sklerose stellt sich die Frage, ob es im Verlauf der Erkrankung eventuell auch zu einer Immunantwort gegen diese endogenen Proteine kommt. Eine zu diesem Thema von Ruprecht et al. durchgeführte Studie fand keine Hinweise für das Auftreten einer Immunantwort gegen die, von MSR/V Sequenzen kodierten, HERV-W Proteine sowie Syncytin-1. Nur einer von 50 Patienten mit MS und keine der 59 Kontrollpersonen wies Antikörper gegen Syncytin-1 auf. Antikörper gegen MSR/V-Gag bzw. Env, also gegen die von HERV-W Xq22.3 sowie 3q26.32 kodierten Proteine konnten weder bei Patienten noch bei Kontrollen nachgewiesen werden. Auch die Suche nach zytotoxischen T – Zellen, welche für HERV-W Gag 3q26.32 bzw. das als MSR/V – Pol bezeichnete, rekombinante HERV-W Protein spezifisch sind, blieb ergebnislos (Ruprecht et al., 2008). Dies bedeutet, dass es offensichtlich im Rahmen der MS nicht zu einer meßbaren zellulären oder humoralen Immunantwort gegen HERV-W Proteine kommt. Diese könnte in einer Immuntoleranz gegenüber, auch unter physiologischen Bedingungen exprimierten, HERV-W Proteinen begründet sein.

7.5 Screening auf Mutation im Stop-Codons in HERV-W-*env* Xq22 Transkripten

Die dargestellten Überlegungen führten zu der Hypothese, dass es eventuell Patienten mit MS geben könnte, welche eine Mutation im Stop Codon des HERV-W-*env* Locus auf Chromosom Xq22.3 aufweisen. Wäre dies der Fall, so bestünde die Möglichkeit, dass es Personen gibt, bei denen dieses HERV-W Provirus ein Env-Protein mit intaktem Signalpeptid exprimiert. Dieses wäre in seiner Struktur quasi identisch zu dem rekombinanten, auf der MSRV Sequenz AF331500 basierenden, Envelope Protein, welches für die bisherigen Studien zu immunologischen Eigenschaften und Expression des Proteins verwandt worden ist (Perron et al., 2001 und 2005 / Antony et al., 2004 / Rolland et al., 2006 / Mameli et al., 2007). Daher untersuchten wir das Genom von 10 Patienten und 10 Kontrollen hinsichtlich einer Mutation im HERV-W-*env* Gen auf Chromosom Xq22. Wie in Kapitel 6.4 beschrieben, fand sich bei einem Patienten ein cDNA Klon (MS-4-K2), welcher ein mutiertes Stop Codon aufwies. Die beobachtete Mutation ist allerdings nicht identisch mit der, in der Sequenz AF331500 enthaltenen Mutation. Der Versuch weitere Klone von der genomischen DNA dieses Patienten herzustellen, welche ebenfalls die neue Mutation aufweisen, scheiterte. Es stellt sich daher die Frage nach der Herkunft der beobachteten Sequenz.

7.5.1 Herkunft der Mutation im Stop-Codon des von genomischer DNA stammenden HERV-W-*env* Xq22.3 Klons MS-4-K2

Prinzipiell gibt es vier Möglichkeiten für den Ursprung der bei MS-4-K2 beobachteten Mutation (siehe Kap. 6.4). Zum einen könnte es sich um einen Fehler der Reversen Transkriptase handeln, zum anderen könnte sie durch einen Fehler der Taq Polymerase an genau dieser Stelle bei der Amplifikation der Sequenz entstanden sein. Auch ein Auftreten einer *in-vivo* Mutation bei der Teilung der Bakterien der Kolonie wäre denkbar. Als letzte Möglichkeit käme das tatsächliche Vorkommen dieser Mutation im Genom des Patienten MS-4 in Frage. Dabei könnte es sich entweder um eine Mutation im HERV-W Gen auf Chromosom Xq22 handeln, oder aber auch um eine hypothetische neue Integration eines HERV-W Provirus in das Genom des Patienten. Um die Herkunft der Mutation genauer zu untersuchen wurde eine erneute PCR auf die DNA der Probe durchgeführt, bei welcher die Primer so gewählt wurden, dass ausschließlich ein auf dem Xq22.3 Chromosom liegendes

env – Gen amplifiziert würde, da einer der Primer außerhalb des proviralen Genoms lag (Xq22genfwd und Xq22genrev). Es wurden neun Klone hergestellt und sequenziert, um sie hinsichtlich des Vorhandenseins der Mutation zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass der HERV-W-*env* Xq22.3 Locus dieses Patienten die Mutation definitiv nicht aufweist. Soll angenommen werden dass die Mutation tatsächlich im Genom des Patienten vorkommt und nicht auf einem *in-vitro* Fehler beruht, so müssten mehrere Bedingungen erfüllt sein. Voraussetzung wäre, dass eine Integration der entsprechenden Sequenz an anderer Stelle des Genoms stattgefunden hat. Bei dem Übertrag von 0,3µl des PCR Produktes der ersten Stufe der Nested PCR ist eine sehr geringe Menge von genomischer DNA des Patienten mit in die zweite PCR Reaktion übertragen worden. Die für die zweite Stufe der Nested PCR verwendeten Primer könnten jetzt die an anderer Stelle im Genom integrierte *env* Sequenz amplifiziert haben und diese anschließend kloniert worden sein. Diese Möglichkeit ist zwar höchst unwahrscheinlich, jedoch nicht prinzipiell auszuschließen. Gäbe es jedoch diese neue Integrationsstelle, so sollte sie sich im Genom des Patienten MS-4 mit geeigneten Methoden nachweisen lassen.

7.5.2 Identifikation eines neuen single nucleotide polymorphism (=SNP) im HERV-W-*env* Xq22.3 Locus

Bei der Suche nach der beschriebenen Punktmutation im Stopcodon des HERV-W-*env* Locus auf Chromosom Xq22 (siehe Kap. 6.4) fiel in den, für die Analyse der Sequenzen erstellten, Alignments bei einigen Proben ein SNP an Position 157 auf. Die Mutation war bei 5 von 10 Kontrollen und nur einem von 10 Patienten vorhanden, was bei der geringen Stichprobengröße allerdings knapp nicht signifikant ist. Dennoch lässt sich über eine Assoziation des SNP mit dem Status als „nicht an MS erkrankter“ Person spekulieren. Eine Klärung der Bedeutung dieses SNP wird sich letztlich nur an einem größeren Patienten- und Kontrollkollektiv ermitteln lassen.

7.6 Resümee

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es sich bei MSR/V entgegen bisheriger Vermutungen nicht um ein neues replikationskompetentes, exogenes Retrovirus handelt. Die als MSR/V bezeichneten Sequenzen stammen von HERV-W Proviren im humanen Genom ab. Einige der an MSR/V beteiligten HERV-W Loci stellen nach unseren Erkenntnissen in humanen

PBMC's Transkripte her, obwohl es sich um prozessierte Pseudogene ohne viralen Promotor handelt. Von einem Provirus auf Chromosom Xq22.3 stammende Transkripte könnten ein Envelope Protein kodieren, welches in der Surface Domäne mit rekombinantem MSR-Env identisch wäre. In der Literatur sind bereits Hinweise für eine proinflammatorische Wirkung dieses Proteins beschrieben. Von anderen Arbeitsgruppen durchgeführte immunhistochemische Studien über das Vorkommen dieses, bislang MSR zugeordneten, Proteins in MS – Läsionen könnten auf eine mögliche Rolle dieses Proteins bei der MS hinweisen. Die Relevanz des identifizierten, neuen SNP im HERV-W Xq22 Locus als möglichem Marker für das MS – Risiko ließe sich im Rahmen einer Studie mit größerer Fallzahl eruieren.

8 Literaturverzeichnis

- Acha-Orbea, H. & H. R. MacDonald.** 1995. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 459 – 486
- Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C.** 2004. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci.* 7: 1088 – 1095.
- Ascherio A & Munger KL.** 2007. Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. Part I: The Role of Infection. *Ann Neurol* 61: 288 – 299.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868 – 871.
- Bénit L, Lallemand JB, Casella JF, Philippe H, Heidmann T.** 1999. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *J Virol.* 73: 3301 – 3308.
- Blond JL, Besème F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet F.** 1999. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol.* 73: 1175 – 1185.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, 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.
- Charcot JM.** 1868. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des hopitaux (Paris)* 41: 554, 557 – 558, 566.
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343 – 346.
- Colmegna I & Garry RF.** 2006. Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 20: 913 – 929.

- Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M.** 1994. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 371: 351 – 355.
- Costas J.** 2002. Characterization of the Intragenomic Spread of the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-W. *Mo. Biol. Evol.* 19: 526 – 533.
- Dolei A, Serra C, Mamei G, Pugliatti M, Sechi G, Cirotto MC, Rosati G, Sotgiu S.** 2002. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology.* 58: 471 – 473.
- Edgar, R C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
- Elian M, Nightingale S, Dean G.** 1990. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53: 906 – 911.
- Elian M & Dean G.** 1993. Motor neuron disease and multiple sclerosis among immigrants to England from the Indian subcontinent, the Caribbean, and east and west Africa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 454 – 457.
- Ellermann V & Bang O.** 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern., *Zentralabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectiionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46, S. 595 - 609.
- Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, Lazarini F, Gebuhrer L, Seigneurin JM, Touraine JL, Sanhadji K, Marche PN, Perron H.** 2003. Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol.* 9: 79 – 93.
- Flockerzi A, Maydt J, Frank O, Ruggieri A, Maldener E, Seifarth W, Medstrand P, Lengauer T, Meyerhans A, Leib-Mösch C, Meese E, Mayer J.** 2007. Expression pattern analysis of transcribed HERV sequences is complicated by ex vivo recombination. *Retrovirology.* 4: 39.
- Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL.** 2006. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev.* 19: 80 – 94.
- Gale CR & Martyn CN.** 1995. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47: 425 – 448.

- Gardner MB, Kozak CA, O'Brien SJ.** 1991. The Lake Casitas wild mouse: evolving genetic resistance to retroviral disease. *Trends Genet.* 7: 22 – 27.
- Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H.** 1998. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet.* 351: 33.
- Garrison KE, Jones RB, Meiklejohn DA, Anwar N, Ndhlovu LC, Chapman JM, Erickson AL, Agrawal A, Spotts G, Hecht FM, Rakoff-Nahoum S, Lenz J, Ostrowski MA, Nixon DF.** 2007. T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 3: e165.
- Garry RF, Krieg AM, Cheevers WP, Montelaro RC, Golding H, Fermin CD, Gallaher WR.** 1995. Retroviruses and their roles in chronic inflammatory diseases and autoimmunity. In: „The Retroviridae“ Herausgeber: Levy JA. vol. 4. Plenum Press, New York, NY. S. 491 – 603.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G.** 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* II: 407 – 10.
- Gifford R & Tristem M.** 2003. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes.* 26: 291 – 315.
- Goff SP.** 2000. Retroviridae: the retroviruses and their replication. In: „Fields virology“ Herausgeber: Knipe DM & Howley PM. 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. S. 1871 – 1939.
- Goldacre MJ, Wotton CJ, Seagroatt V, Yeates D.** 2004. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis: record linkage study. *J Epidemiol Community Health.* 58: 1032 - 1035.
- Gronen F, Ruprecht K, Weissbrich B, Klinker E, Kroner A, Hofstetter HH, Rieckmann P.** 2006. Frequency analysis of HLA-B7-restricted Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with multiple sclerosis and healthy controls. *J Neuroimmunol.* 180: 185 – 192.
- Haahr S, Sommerlund M, Møller-Larsen A, Nielsen R, Hansen HJ.** 1991. Just another dubious virus in cells from a patient with multiple sclerosis? *Lancet* 337: 863 – 864.
- Hervé CA, Lugli EB, Brand A, Griffiths DJ, Venables PJ.** 2002. Autoantibodies to human endogenous retrovirus-K are frequently detected in health and disease and react with multiple epitopes. *Clin Exp Immunol.* 128: 75 – 82.

- Hirschl S, Schanab O, Seppel H, Waltenberger A, Humer J, Wolff K, Pehamberger H, Muster T.** 2007. Sequence variability of retroviral particles derived from human melanoma cells melanoma-associated retrovirus. *Virus Res.* 123: 211 – 215.
- Hughes JF & Coffin JM.** 2005. Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. *Genetics.* 171: 1183 – 1194.
- International Human Genome Sequencing Consortium.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860 – 921
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC.** 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218: 571 – 573.
- Kamradt T & Mitchison NA.** 2001. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med.* 344: 655 – 664.
- Keohavong P & Thilly WG.** 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 9253 – 9257.
- Koch-Henriksen N.** 1999. The Danish Multiple Sclerosis Registry: a 50-year follow-up. *Mult Scler.* 5: 293 – 296.
- Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, Rajoharison A, Garcia E, Mallet F, Mandrand B, Perron H.** 1999. Molecular cloning and characterization of MSR-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology* 260: 1 – 9.
- Kurtzke JF.** 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev* 6: 382 – 427.
- Kurtzke JF.** 1995. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand* 161: 23 – 33.
- Kurtzke JF & Heltberg A.** 2001. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome. *J Clin Epidemiol* 54: 1 – 22.
- Lederberg EM & Cohen SN.** 1974 Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 119: 1072 – 1074.
- Lee YN & Bieniasz PD.** 2007. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog* Jan; 3(1) :e10.
- Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC Jr, Hasty KA, Callaway JC, Zunt J, Desiderio D, Stuart JM.** 2002. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med.* 8: 509 – 513.

- Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R.** 1993. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 4480 - 4484.
- Lublin FD & Reingold SC.** 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 46: 907 – 911.
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ.** 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene.* 108: 1 - 6.
- Luo GX, Taylor J.** 1990. Template switching by reverse transcriptase during DNA synthesis. *J Virol* 64: 4321 – 4328.
- Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, Sotgiu S, Bonetti B, Dolei A.** 2007. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* 88: 264 – 274.
- Martin J, Herniou E, Cook J, Waugh O'Neill R, Tristem M.** 1997. Human endogenous retrovirus type I-related viruses have an apparently widespread distribution within vertebrates. *J Virol.* 71: 437 – 443.
- Meyerhans A, Vartanian JP, Wain-Hobson S.** 1990. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res* 18: 1687 – 1691.
- Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA.** 1994. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 44: 11 – 15.
- Murray RS, Brown B, Brian D, Cabirac GF.** 1992. Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain. *Ann Neurol.* 31: 525 - 533.
- Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Födinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Löwer R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K.** 2003 An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res.* 63: 8735 - 8741.
- Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H.** 2006. Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology.* 3: 44.

- Nevins JR.** 2001. Cell transformation by viruses In: „Fields virology“ Herausgeber: Knipe DM & Howley PM. 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. S. 245 – 283.
- Nowak J, Januszkiewicz D, Pernak M, Liweń I, Zawada M, Rembowska J, Nowicka K, Lewandowski K, Hertmanowska H, Wender M.** 2003. Multiple sclerosis-associated virus-related pol sequences found both in multiple sclerosis and healthy donors are more frequently expressed in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 9: 112 – 117.
- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group.** 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 5: 932 – 936.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M.** 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet.* I: 1031 – 1032.
- Pačes J, Pavlíček A, Zika R, Kapitonov VV, Jurka J, Paces V.** 2004. HERVd: the Human Endogenous RetroViruses Database: update. *Nucleic Acids Res.* 32: D50.
- de Parseval N, Lazar V, Casella JF, Benit L, Heidmann T.** 2003. Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol.* 77: 10414 – 10422.
- de Parseval N & Heidmann T.** 2005. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res.* 110: 318 – 332.
- Pavlíček A, Paces J, Elleder D, Hejnar J.** 2002. Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution. *Genome Res.* 12: 391 – 399.
- Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, Seigneurin JM.** 1989. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol.* 140: 551 – 561.
- Perron H, Lalonde B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, Mallaret M, Schuller E, Stoebner P, Seigneurin JM.** 1991. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet.* 337: 862 – 863.
- Perron H, Gratacap B, Lalonde B, Genoulaz O, Laurent A, Geny C, Mallaret M, Innocenti P, Schuller E, Stoebner P, Seigneurin JM.** 1992. In vitro transmission and antigenicity of a retrovirus isolated from a multiple sclerosis patient. *Res Virol.* 143: 337 – 350.

- Perron H, Suh M, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Stoebner P, Seigneurin JM.** 1993. Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with multiple sclerosis. *J Gen Virol.* 74: 65 – 72.
- Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B.** 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7583 – 7588.
- Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M.** 2001. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal V β 16 T-lymphocyte activation. *Virology.* 287: 321 – 332.
- Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, P  choux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, Cr  ange A, Battail-Poirot N, Siba   G, Santoro L, Jolivet M, Darlix JL, Rieckmann P, Arzberger T, Hauw JJ, Lassmann H.** 2005. Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol.* 11: 23 – 33.
- Pichon JP, Bonnaud B, Cleuziat P, Mallet F.** 2006. Multiplex degenerate PCR coupled with an oligo sorbent array for human endogenous retrovirus expression profiling. *Nucleic Acids Res.* 34: e46.
- Pille ER, Mzokova VM, Andreeva AP, Andzhaparidze OG.** 1977. Possible role of measles, rubella and mumps viruses in multiple sclerosis. *Acta Virol.* 21: 139 – 145.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77: 7415 – 7419.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW.** 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 13: 227 – 231.
- Prudhomme S, Oriol G, Mallet F.** 2004. A retroviral promoter and a cellular enhancer define a bipartite element which controls env ERVWEI placental expression. *J Virol* 78: 12157 – 12168.

- Quint W, Quax W, van der Putten H, Berns A.** 1981. Characterization of AKR murine leukemia virus sequences in AKR mouse substrains and structure of integrated recombinant genomes in tumor tissues. *J Virol.* 39: 1 – 10.
- Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DAS.** 1996. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 119: 449 – 455.
- Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN.** 2006. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol.* 176: 7636 – 7644.
- Roucoux DF & Murphy EL.** 2004. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev.* 6: 144 – 154.
- Ruprecht K, Gronen F, Sauter M, Best B, Rieckmann P, Mueller-Lantzsch N.** 2008. Lack of immune responses against multiple sclerosis-associated retrovirus/human endogenous retrovirus W in patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 14: 143 – 151.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230 : 1350 – 1354.
- Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR.** 2006. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 310:211-50
- Seifarth W, Frank O, Zeilfelder U, Spiess B, Greenwood AD, Hehlmann R, Leib-Mösch C.** 2005. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J Virol.* 79: 341 – 352.
- Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A.** 2001. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci.* 22: 171 – 173.
- Shuman S.** 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* 269: 32678 – 32684
- Simmons A.** 2001. Herpesvirus and multiple sclerosis. *Herpes.* 8: 60 - 63.
- Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arru G, Dolei A.** 2002. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology.* 59: 1071 – 1073.
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B.** 2001. Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity.* 15: 591 – 601.

- Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC. 2000.** Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet.* 9: 2291 – 2296.
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. 2001.** Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity.* 15: 579 – 589.
- Sutkowski N, Chen G, Calderon G, Huber BT. 2004.** Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *J Virol.* 78: 7852 – 7860.
- Temin HM. 1964.** Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Nat Cancer Inst Monogr* 17: 557 – 570.
- Temin HM & Mizutani S. 1970.** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211 – 1213.
- Temin HM, Baltimore D. 1972.** RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Adv Virus Res.* 17: 129 – 186.
- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. 2006.** Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol.* 59: 499 – 503.
- Tuke PW, Perron H, Bedin F, Beseme F, Garson JA. 1997.** Development of a pan-retrovirus detection system for multiple sclerosis studies. *Acta Neurol Scand Suppl.* 169: 16 – 21.
- Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J. 2001.** Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol.* 11: 1531 – 1535.
- Vallé H & Carré H. 1904.** Nature infectieuse de l'anémie du cheval. *C. R. Acad. Sci.* 139: 331 – 333.
- Vogt PK:** Historical introduction to the general properties of retroviruses. In „Retroviruses“ Herausgeber: Coffin JM, Hughes SH und Varmus HE. 1997. New York, Cold Spring Harbor Laboratory S. 1 – 25.
- Villesen P, Aagaard L, Wiuf C, Pedersen FS. 2004.** Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology.* 1: 32.
- Voisset C, Bouton O, Bedin F, Duret L, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G. 2000.** Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16: 731 – 740.

-
- Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ.** 2008. Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72: 157 – 196.
- Weiss RA.** 2006. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* 3: 67.
- White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P.** 1989. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell.* 56: 27 – 35.
- Woodland DL.** 2002. Immunity and retroviral superantigens in humans. *Trends Immunol.* 23: 57 – 58.
- Yi JM, Kim HM, Kim HS.** 2004. Expression of the human endogenous retrovirus HERV-W family in various human tissues and cancer cells. *J Gen Virol.* 85: 1203 – 1210.

9 Publikationen

Ein auf den Ergebnissen dieser Arbeit beruhendes Manuskript mit dem Titel:

Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W loci clarifies the origin of multiple sclerosis – associated retrovirus

Georg Laufer, Jens Mayer, Marlies Sauter, Nikolaus Mueller-Lantzsch, Klemens Ruprecht

befindet sich in Vorbereitung zur Einreichung bei PloS Pathogens.

10 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Virologischen Institut der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. Müller-Lantzsch durchgeführt. Prof. Dr. Müller-Lantzsch möchte ich an dieser Stelle daher für die Bereitstellung der Institutsressourcen sowie die Möglichkeit danken, im Rahmen dieser Dissertation einen Einblick in die Arbeitsweisen der molekularbiologische Forschung zu gewinnen.

Meinem Betreuer, Dr. Klemens Ruprecht, gilt mein ganz besonderer Dank, da er mich mit seinem ansteckenden Optimismus immer motivieren konnte und mich so, bei leider unvermeidlichen Rückschlägen im Laboralltag, vor Verzweiflung bewahrte. Meine „gleitenden“ Arbeitszeiten hat er ohne ein Wort der Kritik erduldet und hatte bei Problemen jederzeit ein offenes Ohr für mich. Mit der notwendigen Kritik bewahrte er mich vor vorschnellen Schlüssen und trug mit seinem hervorragenden fachlichen Wissen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Meiner Kommilitonin Pearl van Heteren gilt mein herzlicher Dank dafür, dass sie mein Interesse für eine Promotion am virologischen Institut in der Arbeitsgruppe von Dr. Ruprecht weckte. Außerdem möchte ich ihr für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit sowie die konstruktive Kritik danken.

Bei meinen Freunden Janto Thierbach, Susi Brandsch und Mirja Lechtenfeld bedanke ich mich für die abwechslungsreichen und schönen Lernmittage im Garten der Emilienstraße während der sehr stressigen Klausurenphase des Laborseesters. Markus Zettler danke ich für die Kaffekränzchen im Labor der Inneren Medizin an langen Laborwochenenden. Bei meinen Kommilitonen Michael Glas, Andreas Maschur, Manuela Olk und Melanie Vogel bedanke ich mich herzlich für die emotionale Unterstützung in Begleitung dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Eltern, sowie meinem Großvater, Hans Laufer, bedanken. Durch meine Eltern erschien mir eine Universitätsausbildung so selbstverständlich und durch ihre finanzielle Unterstützung haben sie mir das Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht. Mit Interesse haben sie diese Doktorarbeit und mein Studium begleitet und mich in schwierigen Zeiten stets aufgemuntert.

11 Lebenslauf

Name	Georg Laufer
Adresse	Stettinerstr.55 66763 Dillingen
Geburtsdatum	07.12.1982
Geburtsort	Saarlouis
Familie	Hans Werner Laufer Gabriele Laufer, geb. Reinhard Julia Laufer
Schullaufbahn	Grundschule 1989 –1993 Albert-Schweitzer-Gymnasium 1993 –2002 Abitur Juni 2002
Studium	Beginn des Studiums der Humanmedizin im Wintersemester 2002 / 2003 in Homburg / Saar Physikum im August / September 2004
Famulaturen	Innere Medizin - Kardiologie 03 / 2005 Neurologie 09 / 2006 Allgemeinmedizin 08 / 2007 Radiologie 09 / 2007
Auslandsaufenthalte:	ERASMUS Aufenthalt an der Universität Oslo, Norwegen 2005 / 2006
Promotionsarbeit	ganztägige Labortätigkeit von 02/2007 bis 07/2007
Aktivität als studentische Hilfskraft:	Sitzwachen in der Inneren Medizin 2003 / 2004 studentischer Tutor im Kursus der makroskopischen Anatomie WS 2004 / 2005 studentischer Tutor im Seminar der speziellen Pharmakologie WS 2007 / 2008 studentische Hilfskraft in der Radiologie 04 / 2008