

Aus dem
Charité Centrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie mit Lehrstuhl für Experimentelle Neurologie
Direktor: Professor Dr. med. M. Endres

Habilitationsschrift

Zur möglichen Rolle humaner endogener Retroviren in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Klemens Ruprecht
geboren am 11. März 1971 in Hamburg

Eingereicht: Februar 2011
Dekanin: Professor Dr. med. A. Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Professor Dr. med. R. Hohlfeld
2. Gutachter: Professor Dr. med. O. Aktas
Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 24. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Multiple Sklerose	5
1.2. Humane endogene Retroviren	6
1.3. Multiple Sklerose und Retroviren	8
1.4. Das Multiple Sklerose-assoziierte Retrovirus (MSRV)	9
1.5. Die humane endogene Retrovirus Familie HERV-W	10
1.6. MSRV/HERV-W und Multiple Sklerose	11
1.7. Fragestellungen dieser Arbeit	12
2. Ergebnisse	14
2.1. Regulation der Expression von HERV-W Proteinen durch Herpes simplex Virus Typ 1	14
2.2. Abwesenheit einer humoralen und zellulären Immunantwort gegen Multiple Sklerose-assoziiertes Retrovirus/humanes endogenes Retrovirus W bei Patienten mit Multipler Sklerose	22
2.3. Analyse der Verpackung von RNA der HERV-K(HML-2) Familie in von der Keimzelltumorzelllinie Tera-1 produzierte retrovirale Partikel – Konsequenzen für MSRV/HERV-W retrovirale Partikel	32
2.4. Klärung des Ursprungs von MSRV <i>env</i> Sequenzen durch systematische Analyse transkribierter HERV-W <i>env</i> loci	43
2.5. Ein HERV-W Element auf Chromosom Xq22.3 kodiert für ein N-terminal trunkiertes Envelope Protein: Charakterisierung <i>in vitro</i> und Expression in MS-Läsionen <i>in vivo</i>	61
3. Diskussion	76
3.1. Regulation von HERV-W Gag und Env Proteinen durch Herpes simplex Virus Typ 1 – mögliche Bedeutung für die Multiple Sklerose	76

3.2.	Zur Identität von MSRV	77
3.2.1.	Immunantworten gegen MSRV/HERV-W	78
3.2.2.	Verpackung von HERV-RNA in retrovirale Partikel	80
3.2.3.	Zum Ursprung von MSRV <i>env</i> Sequenzen	82
3.3.	Entdeckung und Charakterisierung eines neuen HERV-W Env Proteins	85
3.4.	MSRV/HERV-W und MS – Aktueller Stand	89
4.	Zusammenfassung	91
5.	Literaturverzeichnis	94
6.	Danksagung	99
7.	Eidesstattliche Erklärung	101

Abkürzungen

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISPOT	enzyme linked immuno spot technique
Env	envelope protein (Hüllprotein)
ERVWE1	endogenous retroviral family W, env, member 1
ERVWE2	endogenous retroviral family W, env, member 2
Gag	group-specific antigen (Matrix-, Capsid- und Nucleocapsidproteine)
HAM/TSP	HTLV-1-assozierte Myelopathie/tropische spastische Paraparese
HBMEC	human brain microvascular endothelial cells
HCEC	human cerebral endothelial cells
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HLA	human leukocyte antigen
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
ICP0	infected cell protein 0
LTR	long terminal repeat
MS	Multiple Sklerose
MSRV	Multiple Sklerose-assoziertes Retrovirus
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
PBS	primer binding site
PCR	polymerase chain reaction
RVLPs	retrovirus-like particles
SU	surface Domäne eines retroviralen Env Proteins
TLR	toll-like Rezeptor
tRNA	transfer ribonucleic acid
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die überwiegend zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auftritt (Compston und Coles, 2008). Mit einer Prävalenz von ca. 1 auf 1000 ist die MS hierzulande die häufigste neurologische Erkrankung, die im jüngeren Erwachsenenalter zu bleibenden neurologischen Ausfallserscheinungen führt (Rieckmann und Toyka, 2005). Wie durch die synonyme Krankheitsbezeichnung *Encephalomyelitis disseminata* treffend ausgedrückt handelt es sich neuropathologisch um eine disseminierte Entzündung, die sich vorwiegend im Bereich der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark abspielt (Lucchinetti et al., 1998). Je nach Verteilung und Ausmaß des ZNS-Befalls ist das klinische Spektrum der MS ausgesprochen breit und umfasst eine Vielzahl neurologischer Symptome. Typische Manifestationen einer MS sind eine Visusstörung im Rahmen einer Sehnervenentzündung (Optikusneuritis), motorische Ausfallserscheinungen (z.B. spastische Paraparese, progrediente Gangstörung), Hirnstamm- und Kleinhirnsymptome, sensible Ausfallserscheinungen, Blasenstörungen, sowie neuropsychologische Beeinträchtigungen (Compston und Coles, 2008). Bei ca. 85% der Patienten verläuft die MS zunächst einen schubförmigen Verlauf (relapsing-remitting MS); bei mindestens der Hälfte dieser Patienten geht die Erkrankung später in eine sekundär-chronisch progrediente Phase über (secondary progressive MS). Bei ca. 15% der Betroffenen verläuft die Erkrankung von Anfang an primär progredient (primary progressive MS).

Seit Mitte der 1990er Jahre wurden verschiedene immunmodulierende und immunsuppressive Therapien (Interferon-beta 1a, Interferon-beta 1b, Glatirameracetat, Natalizumab, Mitoxantron, Azathioprin), mit denen eine gewisse Beeinflussung klinischer und kernspintomographischer Krankheitsparameter erreicht werden kann, für die Behandlung der MS zugelassen (Wiendl et al., 2008). Dennoch stellt die MS derzeit weiterhin eine letztlich unheilbare Erkrankung dar. Eine entscheidende Voraussetzung für

die Entwicklung kausal wirksamer und somit kurativer Behandlungsformen der MS ist ein besseres Verständnis ihrer Ätiologie und Pathogenese. Trotz intensiver wissenschaftlicher Anstrengungen ist die Ätiologie der MS jedoch nach wie vor ungeklärt. Die Ergebnisse verschiedener epidemiologischer Studien, sowie von Zwillingsstudien und genetischen Untersuchungen lassen sich jedoch zusammenfassend dahingehend interpretieren, dass die MS – wie diverse andere multifaktoriell bedingte Erkrankungen auch - auf dem Boden einer komplexen Interaktion von genetischen und Umweltfaktoren entsteht (Ebers, 2008; Goodin, 2009; Ramagopalan et al., 2010).

1.2. Humane endogene Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* (Retroviren) umfasst sieben Genera, nämlich α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren, sowie Lentiviren und Spumaviren (Modrow et al., 2003). Charakteristikum des Replikationszyklus aller Retroviren ist das Umschreiben ihrer einzelsträngigen genomischen retroviralen RNA in eine doppelsträngige DNA Kopie, die stabil in das Wirtsgenom integriert wird. Dieser Prozess wird als reverse Transkription bezeichnet, was sich im Namen der Retroviren widerspiegelt. Die reverse Transkription wird durch ein retrovirales Enzym, die reverse Transkriptase, katalysiert. Die in das Wirtsgenom integrierte retrovirale doppelsträngige DNA nennt man Provirus. Die Genome aller infektiösen Retroviren besitzen ein *gag* Gen, das für die Matrix-, Capsid- und Nucleocapsidproteine kodiert, ein *pol* Gen, das für die enzymatischen Aktivitäten (u.a. die reverse Transkriptase) kodiert, sowie ein *env* Gen, welches für die retroviralen Hüllproteine (Envelope Proteine) kodiert. Diese drei kodierenden Regionen werden am 5' und am 3' Ende von regulatorischen Sequenzen, den sog. long terminal repeats (LTRs) flankiert (Modrow et al., 2003).

Interessanterweise enthalten die Genome aller bisher untersuchten Wirbeltiere Elemente, die eine hohe Ähnlichkeit zu retroviralen Sequenzen besitzen. Diese Sequenzen werden als endogene Retroviren (ERV) bezeichnet und gehen auf im Laufe der Evolution stattgefundene Infektionen von Keimbahnzellen durch exogene Retroviren zurück.

Hierdurch können sich ursprünglich exogene Retroviren fest im Genom ihrer Wirte integrieren und werden fortan, wie anderweitige Wirtsgene auch, an die nächsten Generationen weitervererbt (Bannert und Kurth, 2004; Boeke und Stoye, 1997; de Parseval und Heidmann, 2005). Das menschliche Genom besteht zu ca. 8% aus humanen endogenen Retroviren (HERV) - im Gegensatz dazu machen Protein-kodierende Gene nur etwas 1,5% des menschlichen Genoms aus (Lander et al., 2001).

HERVs lassen sich in ca. 30 Familien unterteilen, wobei die jeweiligen Familien einige wenige bis zu mehrere hundert Elemente umfassen können (de Parseval und Heidmann, 2005; Katzourakis und Tristem, 2005). Die unterschiedlichen HERV Familien werden nach der Aminosäurespezifität der transfer RNA (tRNA) benannt, welche an die primer binding site (PBS) im 5'LTR des retroviralen Genoms bindet (Blomberg et al., 2005). Es erscheint wichtig hervorzuheben, dass im Gegensatz zu „normalen“ menschlichen Genen, die in der Regel an einem einzigem chromosomalem Genort in einer einzigen Kopie vorliegen, die zu einer HERV-Familie gehörigen Elemente oft in einer Vielzahl von Kopien an unterschiedlichen Genorten über verschiedene Chromosomen verteilt vorkommen. Durch Ansammlung von Deletionen, Stop-Kodonen und Leserahmen-Mutationen sind praktisch alle HERV-Familien im Laufe der Evolution hochgradig defekt geworden. Insbesondere konnte bislang kein einziges replikationskompetentes HERV-Allel identifiziert werden, d.h. alle bekannten HERVs sind nicht-infektiös und nicht in der Lage neue Proviren zu bilden. Dennoch haben einige HERV loci komplette offene Leserahmen für einzelne endogen retrovirale Proteine behalten, welche unter physiologischen aber auch pathologischen Bedingungen im menschlichen Organismus exprimiert werden können (de Parseval und Heidmann, 2005). Eine bestimmte HERV-Familie, HERV-K (HML-2), besitzt darüber hinaus sogar die Fähigkeit zur Produktion retroviraler Partikel (Boller et al., 2008; Tonjes et al., 1997).

In Analogie zu exogenen Retroviren wurden ERVs bei verschiedenen Krankheiten, insbesondere Tumor- und Autoimmunerkrankungen, involviert (Blomberg et al., 2005;

Nakagawa und Harrison, 1996; Ruprecht et al., 2008c). In bestimmten Mausmodellen für Tumorerkrankungen gibt es in der Tat schlüssige Evidenzen für eine pathogenetisch relevante Rolle von ERVs (Ruprecht et al., 2008c). Hinsichtlich der Frage einer Beteiligung von HERVs an humanen Erkrankungen lässt die aktuelle Datenlage zwar keine abschließende Beurteilung zu, es liegen jedoch einzelne Beispiele vor, die dafür sprechen, dass HERVs möglicherweise eine Rolle als Ko-Faktoren bei bestimmten humanen Erkrankungen spielen könnten (Douville et al., 2011; Lamprecht et al., 2010; Ruprecht et al., 2008c).

1.3. Multiple Sklerose und Retroviren

1980 beschrieben Robert C. Gallo und Mitarbeiter mit dem humanem T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV-1) das erste humanpathogene Retrovirus (Poiesz et al., 1980), das später als ätiologisches Agens der adulten T-Zell Leukämie erkannt wurde (Robert-Guroff et al., 1982). Darüber hinaus konnte 1985 gezeigt werden, dass HTLV-1 ebenfalls Auslöser einer bis zu diesem Zeitpunkt ätiologisch unverstandenen neurologischen Erkrankung ist, nämlich der HTLV-1-assoziierten Myelopathie/tropischen spastischen Paraparese (HAM/TSP) (Gessain et al., 1985). Nachdem die HAM/TSP verschiedene klinische und neuropathologische Ähnlichkeiten mit der MS aufweist, stellte sich die Frage, inwiefern Retroviren auch bei der MS eine Rolle spielen könnten. In der Tat erbrachten mehrere initiale Arbeiten serologische und PCR-basierte Hinweise dafür, dass HTLV-1, oder ein mit HTLV-1 verwandtes Retrovirus, mit der MS assoziiert sein könnten (Greenberg et al., 1989; Koprowski et al., 1985; Reddy et al., 1989). Allerdings konnte dieser Zusammenhang in methodisch hochwertigen Folgeuntersuchungen nicht bestätigt werden (Ehrlich et al., 1991; Fugger et al., 1990). Insgesamt liegen somit keine überzeugenden Evidenzen für eine Assoziation von HTLV-1 mit der MS vor.

Stimuliert durch die initialen Ergebnisse zu HTLV-1 begannen Ende der 1990er Jahre unabhängig voneinander eine dänische und eine französische Arbeitsgruppe ebenfalls direkt nach „neuen“ Retroviren bei Patienten mit MS zu fahnden. Dies führte zur

Beschreibung extrazellulärer Retrovirus-artiger Partikel (retrovirus-like particles, RVLPS) sowie von reverser Transkriptase Aktivität in Zellkulturüberständen von Patienten mit MS (Christensen, 2005). Hierbei konnte die französische Arbeitsgruppe um Hervé Perron RVLPS und reverse Transkriptase Aktivität in Überständen einer leptomeningealen Zelllinie (LM7), die aus dem Liquor eines Patienten mit MS etabliert worden war, identifizieren (Perron et al., 1989). Die spontane Produktion von „LM7-Virus“ durch diese Zellen erwies sich als niedrig, konnte aber durch Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Infektion von LM7 Zellen mit Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) verstärkt werden (Perron et al., 1993). In einer weiteren Arbeit beschrieben Perron und Mitarbeiter ebenfalls reverse Transkriptase Aktivität und RVLPS in Überständen von kultivierten Monozyten von Patienten mit MS (Perron et al., 1991). Da Seren von 2 dieser Patienten im Western blot mit aufgereinigten LM7 Virus Partikeln reagierte, ergab sich die Schlussfolgerung, dass es sich bei der in Monozyten identifizierten Entität ebenfalls um LM7-Virus handelt (Perron et al., 1991).

1.4. Das Multiple Sklerose-assoziierte Retrovirus (MSRV)

Um ein virales Genom zu identifizieren, welches für das LM7-Virus kodiert, wurde hierauf aus über Sucrose-Gradienten aufgereinigten Überständen von Plexus choroideus und Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalisierten B-Zelllinien von Patienten mit MS RNA extrahiert und einer „Pan-Retro“ RT-PCR unterzogen (Perron et al., 1997). Bei dieser PCR-Technik werden bei relativ niedrigen annealing-Temperaturen degenerierte Primer verwendet, die eine bei allen Retroviren konservierte Region im Bereich des *pol* Genes amplifizieren (Tuke et al., 1997). Hierdurch konnten in Gradientenfraktionen, welche reverse Transkriptase Aktivität enthielten, gammaretrovirale *pol* Sequenzen amplifiziert werden, die sich von allen damals bekannten retroviralen *pol* Sequenzen unterschieden. Aus verschiedenen überlappenden Klonen wurde daraufhin eine Konsensus Protease/reverse Transkriptase Sequenz zusammengesetzt, die als MS-assoziiertes Retrovirus (MSRV) bezeichnet wurde (Perron et al., 1997). Ausgehend von dieser *pol* Sequenz wurden durch RT-PCR Extension weitere überlappende cDNA Klone mit

Fragmenten angrenzender genomischer Regionen aus Plasma bzw. aus aufgereinigten Zellkulturüberständen EBV-transformierter mononukleärer Blutzellen von Patienten mit MS generiert. Aus diesen Klonen ließ sich ein 7630 Nukleotide umfassendes, retrovirales „MSRV Genom“ konstruieren (Komurian-Pradel et al., 1999). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass bislang kein zusammenhängendes und komplettes MSRV Genom charakterisiert werden konnte, vielmehr ist MSRV ausschließlich durch mehrere z.T. überlappende cDNA Klone definiert. Auch besitzt die Mehrzahl der veröffentlichten MSRV *gag*, *pol* und *env* Sequenzen keine kompletten offenen Leserahmen, somit ist es unwahrscheinlich, dass diese Sequenzen für ein intaktes Retrovirus kodieren (Komurian-Pradel et al., 1999).

1.5. Die humane endogene Retrovirus Familie HERV-W

Bereits bei der initialen Beschreibung von MSRV wurde in southern blots mit einer MSRV *pol* Sonde eine Hybridisierung mit zahlreichen endogenen Sequenzen in humaner DNA beobachtet (Perron et al., 1997). In einer anschließenden Arbeit konnte davon ausgehend mit Hilfe von MSRV Sonden eine bis dahin unbekannte HERV Familie im humanem Genom identifiziert werden. Nachdem die primer binding site dieser Familie tRNAs für Tryptophan (Aminosäurecode „W“) bindet, wurde sie HERV-W benannt (Blond et al., 1999). HERV-W ist eine Multikopie-Familie bestehend aus ca. 650 im humanem Genom verstreuten Elementen (Pavlicek et al., 2002). Ca. 280 dieser Elemente enthalten interne Sequenzen, während es sich bei den restlichen HERV-W Elementen um durch Rekombination von LTRs und Deletion der internen Sequenzen entstandene sog. „solo-LTRs“ handelt (Pavlicek et al., 2002). Phylogenetische Untersuchungen legen nahe, dass HERV-W vor 40 bis 25 Millionen Jahren in das Genom der menschlichen Vorfahren eingedrungen ist (Voisset et al., 1999). Wie alle endogenen Retrovirus Familien ist HERV-W weitgehend defekt und bislang konnte im humanem Genom kein einziges komplettes replikationskompetentes HERV-W Element identifiziert werden (Voisset et al., 2000). Innerhalb der HERV-W Familie gibt es jedoch insgesamt 13 Elemente mit einem Volllänge *env* Gen, wovon eines einen ununterbrochenen offenen Leserahmen besitzt

(de Parseval et al., 2003). Dieses auf Chromosom 7q21.2 gelegene Element (Genname: ERVWE1) kodiert für ein intaktes HERV-W Env Protein (Proteinname: Syncytin-1), das höchstwahrscheinlich eine physiologische Rolle bei der Fusion der Zytotrophblastenzellen zum Synzytiotrophblasten und damit in der Morphogenese der Plazenta spielt (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). Der ERVWE1 locus kann somit *bona fide* als ein humanes Gen angesehen werden und stellt eines der am besten untersuchten Beispiele für ein im Laufe der Evolution „domestiziertes“ retrovirales Gen dar, welches eine physiologische Funktion im Wirtsorganismus übernommen hat (Mallet et al., 2004).

1.6. MSRV/HERV-W und Multiple Sklerose

Da MSRV/HERV-W ursprünglich im Kontext der MS identifiziert worden war befassten sich verschiedene Arbeiten mit der Frage einer möglichen Rolle von MSRV/HERV-W bei der MS. Hierbei berichteten mehrere Untersuchungen über eine häufigere Detektion von extrazellulären „Partikel-assoziierten“ MSRV/HERV-W *pol* RNA Sequenzen in Serum, Plasma oder Liquor von Patienten mit MS im Vergleich zu Kontrollen (Dolei et al., 2002; Garson et al., 1998; Nowak et al., 2003; Serra et al., 2001). Extrazelluläre HERV-W RNA Sequenzen fanden sich allerdings auch in Liquor und Plasma von Patienten mit Schizophrenien häufiger als bei Kontrollen (Karlsson et al., 2001; Karlsson et al., 2004). In verschiedenen Arbeiten zeigte sich eine höhere Expression von MSRV/HERV-W *env* RNA in Hirngewebe von Patienten mit MS im Vergleich zu Hirngewebe von gesunden Kontrollen (Antony et al., 2006; Antony et al., 2004; Antony et al., 2007b; Mameli et al., 2007). Darüber hinaus konnte in immunhistochemischen Untersuchungen mit einem monoklonalem Anti-HERV-W Env Antikörper (6A2B2) die Expression eines HERV-W Env Proteins in Mikrogliazellen und Astrozyten in aktiv demyelinisierenden MS-Läsionen demonstriert werden (Antony et al., 2007a; Antony et al., 2004; Mameli et al., 2007).

Hinsichtlich möglicher Mechanismen, durch die MSRV/HERV-W bei der MS eine Rolle spielen könnte, wurde berichtet, dass das vermutliche MSRV Env Protein (AAK18189.1) Eigenschaften eines Superantigens besitzt (Perron et al., 2001). Darüber hinaus hat die

surface (SU) Domäne des MSR/V Env Proteins, welches auf Aminosäuren-Ebene zu 87% identisch mit Syncytin-1 ist, proinflammatorische Effekte via Aktivierung von CD14 und toll-like Rezeptor 4 (TLR4) (Rolland et al., 2006). Die Produktion von Interferon- γ , Interleukin-6, und Interleukin-12p40 durch mononukleäre Blutzellen nach Stimulation mit MSR/V Env SU war bei Patienten mit MS höher als bei Kontrollen (Rolland et al., 2005).

Die stärksten Evidenzen für eine mögliche funktionelle Relevanz der HERV-W Env Expression in MS Läsionen stammen jedoch aus Arbeiten einer kanadischen Gruppe um Christopher Power, in denen nachgewiesen werden konnte, dass die Expression von Syncytin-1 in Astrozyten *in vitro* einerseits die Produktion proinflammatorischer Moleküle induziert, andererseits insbesondere aber auch zur Sezernierung von Faktoren führt, die zytotoxisch auf Oligodendrozyten wirken (Antony et al., 2004). Zusätzlich resultierte die Expression von Syncytin-1 in Mausmodellen in einem Untergang von Oligodendrozyten und Demyelinisierung *in vivo* (Antony et al., 2007a; Antony et al., 2004). Nachdem ein Oligodendrozytenuntergang mit konsekutiver Demyelinisierung ein wesentliches neuropathologisches Substrat der MS darstellt, lässt sich aus diesen Befunden eine möglicherweise pathogenetisch relevante Rolle von Syncytin-1 bei der MS ableiten.

1.7. Fragestellungen dieser Arbeit

In der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift wurden verschiedene Kernfragen zu MSR/V/HERV-W und deren möglicher Bedeutung für die MS in Originalarbeiten untersucht. Zunächst wurde die Regulation der Expression von MSR/V/HERV-W Proteinen durch anderweitige virale Erreger am Beispiel von HSV-1 analysiert (Ruprecht et al., 2006). Daraufhin wurden humorale und zelluläre Immunantworten gegen MSR/V/HERV-W Proteine bei Patienten mit MS und Kontrollen untersucht (Ruprecht et al., 2008b). In einer weiteren Arbeit wurde an Hand der humanen Keinzelltumor-Zelllinie Tera-1, welche von der HERV-K (HML2) Familie enkodierte retrovirale Partikel produziert, die Verpackung von HERV Transkripten in retrovirale Partikel studiert. Dies erfolgte mit dem

Ziel, in einem etabliertem Modell Rückschlüsse auf die mögliche Verpackung von MSRV/HERV-W Transkripten in retrovirale Partikel ziehen zu können (Ruprecht et al., 2008a). Zusätzlich wurde die zentrale Frage des Ursprungs der publizierten MSRV *env* Sequenzen und damit die Frage der eigentlichen Identität von MSRV durch eine systematische Analyse transkribierter HERV-W *env* loci sowie publizierter MSRV *env* Sequenzen bearbeitet (Laufer et al., 2009). Hierbei konnte u.a. ein auf Chromosom Xq22.3 gelegener transkribierter HERV-W *env* locus identifiziert werden, der nach einem einzigem vorzeitigem N-terminalem Stop-Codon einen langen offenen Leserahmen für ein 475 Aminosäuren langes N-terminal trunkiertes HERV-W Env Protein besitzt. In einer abschließenden Arbeit wurden die Expression und Eigenschaften dieses N-terminal trunkierten HERV-W Env Proteins *in vitro* charakterisiert, sowie die Expression von Xq22.3 HERV-W Env in MS-Läsionen *in vivo* untersucht (Roebke et al., 2010).

2. Ergebnisse

2.1. Regulation der Expression von HERV-W Proteinen durch Herpes simplex

Virus Typ 1

Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, Gronen F, Kim KS, Perron H, Schneider-Schaulies J, Rieckmann P. Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J. Neurovirol.* 2006; 12: 65-71.

Eine Transaktivierung durch exogene Faktoren, wie z.B. Herpesviren, stellt einen möglichen Mechanismus dar, durch den endogene Retroviren aktiviert werden und eine Rolle bei humanen Erkrankungen spielen könnten. In diesem Zusammenhang wurde die Regulation von HERV-W Gag und Env Proteinen durch HSV-1 in neuronalen Zellen (IMR-32), primären humanen cerebralen Endothelzellkulturen (HCEC) sowie in einer immortalisierten humanen cerebralen Endothelzelllinie (HBMEC) untersucht. In IMR-32 Zellen konnte mittels western blots bereits vier Stunden nach HSV-1 Infektion das HSV-1 immediate early Protein infected cell protein 0 (ICP0) detektiert werden, während sich ICP0 in HCEC und HBMEC erst 48 Stunden post infectionem fand. Mit Hilfe eines monoklonalen Anti-HERV-W Env Antikörpers und eines polyklonalen Anti-HERV-W Gag Serums konnte in allen drei untersuchten Zelltypen zeitgleich mit der Expression von ICP0 eine Induktion von HERV-W Env und Gag Proteinen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen am Beispiel von HSV-1, dass exogene virale Trigger in der Tat zu einer Transaktivierung bestimmter HERV-W loci mit konsekutiver Expression von endogenen retroviralen Proteinen führen können.

2.2. Abwesenheit einer humoralen und zellulären Immunantwort gegen Multiple Sklerose-assoziiertes Retrovirus/humanes endogenes Retrovirus W bei Patienten mit Multipler Sklerose

Ruprecht K, Gronen F, Sauter M, Best B, Rieckmann P, Mueller-Lantzsch N. Lack of immune responses against multiple sclerosis-associated retrovirus/human endogenous retrovirus W in patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol* 2008; 14: 143-51

Infektionen mit exogenen Retroviren, aber auch eine aberrante Expression von endogenen Retroviren, lösen typischerweise humorale und zelluläre Immunreaktionen aus. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit humorale und zelluläre Immunantworten gegen MSR/HERV-W Proteine bei Patienten mit MS und Kontrollen untersucht. Antikörper gegen Syncytin-1, sowie gegen MSR Gag und Env Proteine wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert, nachdem die entsprechenden Proteine mit einem Baculovirus-Expressionsystems in Insektenzellen exprimiert worden waren. Syncytin-1 Antikörper fanden sich bei einem von 50 Patienten mit MS und bei keiner von 59 Kontrollen. Antikörper gegen MSR Env oder Gag fanden sich weder bei Patienten noch bei Kontrollen. Ebenso wenig konnten in 20 Liquorproben von Patienten mit MS sowie in 30 Liquorproben von Kontrollen Antikörper gegen Syncytin-1, MSR Gag oder Env detektiert werden. Zum Nachweis zellulärer Immunantworten wurden 23 HLA-B7-positive Patienten mit MS und 29 HLA-B7-positive Kontrollen mit 36 HLA-B7-restringierten MSR/HERV-W Gag-, Protease- und reverse Transkriptase-Peptiden mittels ELISPOT untersucht. Bei keinem Patienten und keiner Kontrolle ließen sich zelluläre Immunantworten gegen die untersuchten Peptide nachweisen. Insgesamt sprechen die erhobenen Daten dafür, dass bei Patienten mit MS keine nennenswerten humoralen oder zellulären Immunantworten gegen die untersuchten MSR/HERV-W Proteine vorliegen.

2.3. Analyse der Verpackung von RNA der HERV-K(HML-2) Familie in von der Keimzelltumorzelllinie Tera-1 produzierte retrovirale Partikel – Konsequenzen für MSRV/HERV-W retrovirale Partikel

Ruprecht K, Ferreira H, Flockerzi A, Wahl S, Sauter M, Mayer J, Mueller-Lantzsch N: Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21. *J Virol* 2008, 82(20):10008-10016.

Nachdem verschiedene Autoren aus dem Nachweis von MSRV RNA im Zellkulturüberstand oder Plasma auf die Existenz von durch MSRV encodierte retrovirale Partikel geschlossen haben, sollte diese Annahme in einem etablierten Modell überprüft werden. Hierfür wurde die humane Keimzelltumorzelllinie Tera-1 verwendet, welche von der HERV-K (HML-2) Familie encodierte retrovirale Partikel produziert. Mittels quantitativer RT-PCR von RNA aus Tera-1 Zellen und Tera-1 retroviralen Partikeln konnte gezeigt werden, dass HERK (HML-2) *gag* und *env* RNA Transkripte hochselektiv in Tera-1 retrovirale Partikel verpackt werden. Darüber hinaus kommt es jedoch auch zu einer unselektiven Mitverpackung von RNA Transkripten von anderen HERV Familien (HERV-W, HERV-H) und von zellulären housekeeping Genen in Tera-1 retrovirale Partikel. Sequenzierungen der in Tera-1 retrovirale Partikel verpackten HERV-K (HML-2) RNA Transkripte zeigten, dass diese Transkripte fast ausnahmslos von einem bestimmten HERK (HML-2) locus auf Chromosom 22q11.21 abstammen. Innerhalb von 8 in Tera-1 Zellen identifizierten transkriptionsaktiven HERK (HML-2) loci erwies sich der 22q11.21 locus als der transkriptionell aktivste. Da der 22q11.21 locus einen kompletten offenen Leserahmen für ein HERV-K (HML-2) Gag Protein besitzt, dürfte er wesentlich an der Produktion von retroviralen Partikeln durch Tera-1 Zellen beteiligt sein. Diese Ergebnisse tragen einerseits zum besseren Verständnis der Produktion von retroviralen Partikeln durch Tera-1 Zellen bei. Andererseits spricht die unselektive Mitverpackung von HERV-W

und HERV-H RNA in Tera-1 retrovirale Partikel dafür, dass der alleinige Nachweis von RNA einer bestimmten HERV Familie im ultrazentrifugiertem Zellkulturüberstand nicht automatisch auf die Existenz von durch diese HERV Familie produzierten retroviralen Partikeln schließen lassen darf.

2.4. Klärung des Ursprungs von MSRV *env* Sequenzen durch systematische Analyse transkribierter HERV-W *env* loci

Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantsch N, **Ruprecht K**: Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W *env* loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus *env* sequences. *Retrovirology* 2009, 6:37.

MSRV Sequenzen wurden ursprünglich in Überständen von Zellkulturen und im Plasma von Patienten mit MS mittels RT-PCR identifiziert. MSRV wurde hierbei durch verschiedene überlappende cDNA Klone definiert, ein Vollängen MSRV-Genom liegt nicht vor. Auch wenn die beschriebenen MSRV Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu endogenen HERV-W Sequenzen aufweisen, war der exakte Ursprung von MSRV Sequenzen unklar und umschriebene HERV-W loci, auf welche sich MSRV Sequenzen zurückführen lassen, waren bislang unbekannt. In dieser Arbeit untersuchten wir daher systematisch mittels RT-PCR, Klonierung, Sequenzierung und Zuordnung der erhaltenen Sequenzen zu individuellen HERV-W *env* loci transkriptionsaktive HERV-W *env* Elemente in mononukleären Blutzellen von Patienten mit MS und Kontrollen. Hierbei konnten wir insgesamt 7 transkribierte HERV-W *env* Elemente identifizieren, wobei sich keine Unterschiede im Transkriptionsmuster zwischen Patienten und Kontrollen zeigten. Interessanterweise handelte es sich bei fast einem Drittel der 332 analysierten Sequenzen um *in vitro* Rekombinationen von Transkripten unterschiedlicher HERV-W *env* loci. Eine hierauf durchgeführte Re-Analyse bislang publizierter MSRV *env* Sequenzen zeigte, dass sich sämtliche MSRV *env* Sequenzen auf spezifische genomische HERV-W *env* loci bzw. Rekombinationen zwischen diesen loci zurückführen lassen. Diese Daten legen nahe, dass vormals als „MSRV *env*“ bezeichnete Sequenzen tatsächlich von einzelnen genomischem HERV-W *env* loci bzw. von *in vitro* Rekombinationen von Transkripten verschiedener HERV-W loci abstammen. Dies spricht klar gegen die Auffassung, dass es sich bei MSRV um ein infektiöses, replikationskompetentes, exogenes Retrovirus handeln könnte.

2.5. Ein HERV-W Element auf Chromosom Xq22.3 kodiert für ein N-terminal trunkiertes Envelope Protein: Charakterisierung *in vitro* und Expression in MS-Läsionen *in vivo*

Roebke C, Wahl S, Laufer G, Stadelmann C, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Mayer J,

Ruprecht K: An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3. *Retrovirology* 2010, 7:69.

In der vorangegangenen Arbeit stellte sich heraus, dass ein auf Chromosom Xq22.3 gelegenes HERV-W *env* Element in humanen mononukleären Blutzellen transkribiert wird. Der *env* Leserahmen dieses HERV-W Elementes ist durch ein einziges vorzeitiges Stop-Kodon an Position 39 unterbrochen, besitzt jedoch darüber hinaus einen langen offenen Leserahmen für ein N-terminal trunkiertes 475 Aminosäuren HERV-W Env Protein. In dieser Arbeit sollten die Fähigkeit des Xq22.3 HERV-W *env* locus zur Proteinexpression untersucht sowie das exprimierte Protein weiter charakterisiert werden. Eine transiente eukaryote Expression des Xq22.3 HERV-W *env* offenen Leserahmens resultierte in der Tat in der Expression eines N-terminal trunkierten HERV-W Env Proteins. Zudem konnte durch Elimination des Stop-Kodons an Position 39 in Xq22.3 HERV-W *env* ein Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Protein rekonstituiert werden. Während es sich bei dem Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Protein um ein glykosyliertes Protein handelt, das Oligomere bildet und an der Zelloberfläche exprimiert wird und somit typische Eigenschaften eines retroviralen Env Proteins aufweist, ist das N-terminal trunkierte Xq22.3 HERV-W Env Protein unglykosyliert, bildet keine Oligomere und verbleibt intrazellulär. In immunhistochemischen Untersuchungen reagierte ein gegen Xq22.3 HERV-W Env gerichteter monoklonaler Antikörper mit einem in akuten MS-Läsionen exprimiertem Antigen. Diese Daten sprechen dafür, dass ein teilweise defektes HERV-W *env* Gen auf Chromosom Xq22.3 in der Lage ist, *ex vivo* ein trunkiertes HERV-W Env Protein zu produzieren, das möglicherweise auch *in vivo* in akuten MS-Läsionen exprimiert wird.

3. Diskussion

3.1. Regulation von HERV-W Gag und Env Proteinen durch Herpes simplex

Virus Typ 1 – mögliche Bedeutung für die Multiple Sklerose

In der ersten hier dargestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* Infektion von neuronalen Zellen (IMR-32) und von humanen zerebralen Endothelzellkulturen durch HSV-1 mit einer Induktion von HERV-W Gag und Env Proteinen assoziiert ist (Ruprecht et al., 2006). Diese Befunde stehen im Einklang mit einer anderweitigen Arbeit, die über eine Transaktivierung von HERV-W Elementen ebenfalls auf mRNA Ebene nach Infektion mit HSV-1 bzw. Influenza A/WSN/33 Virus berichtete (Nellaker et al., 2006). Auch konnte mittels Luciferase Assays demonstriert werden, dass eine Infektion mit HSV-1 zu einer direkten Transaktivierung eines HERV-W LTRs (also derjenigen Region im HERV-W Genom, welche regulatorische Elemente für die HERV-W Transkription enthält) führt, und dass dieser Effekt partiell durch das HSV-1 ICP0 Protein mediiert wird (Lee et al., 2003). Vor diesem Hintergrund erscheinen die Ergebnisse unserer Untersuchung vereinbar mit einer Induktion von HERV-W Gag und Env durch HSV-1 via ICP0. Es wurde verschiedentlich spekuliert, dass eine Transaktivierung von HERV Elementen einen pathogenetischen Mechanismus unterschiedlicher vormalig mit der MS in Zusammenhang gebrachter (Herpes-)Viren darstellen könnte (Christensen, 2005; Haahr et al., 1992; Perron, 2001; Ruprecht und Perron, 2005). Möglicherweise relevant erscheint in diesem Kontext auch die Transaktivierung eines HERV-K *env* Genes mit superantigenen Eigenschaften durch EBV (Sutkowski et al., 2001; Tai et al., 2008). Davon ausgehend sind die wesentlichen Ergebnisse unserer Arbeit einerseits der grundsätzliche Nachweis, dass von der HERV-W Familie kodierte Proteine in humanen Zellkulturen exprimiert werden können, was dafür spricht, dass einzelne HERV-W loci immer noch in der Lage sind, endogen retroviral enkodierte Proteine zu produzieren. Andererseits belegt die Induktion von HERV-W Gag und Env durch HSV-1, dass infektiöse Triggerfaktoren die Expression von HERV-W Proteinen regulieren können. Nachdem das HERV-W Env Protein Syncytin-1 oligodendrotoxische und proinflammatorische Eigenschaften hat (Antony et

al., 2007a; Antony et al., 2004) könnte eine Heraufregulation dieses Proteins durch HSV-1 eine für die MS relevante Rolle spielen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde basieren auf dem Nachweis von HERV-W Gag und Env Proteinen in western blots mittels eines polyklonalen Anti-MSRV/HERV-W Gag Serums (F45128) und eines monoklonalen Anti-MSRV/HERV-W Env Antikörpers (3B2H4). Diese Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen bzw. Mäusen mit von MSRV Klonen enkodierten Proteinen hergestellt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Identität von MSRV noch ungeklärt, allerdings musste davon ausgegangen werden, dass Anti-MSRV Antikörper HERV-W Proteine detektieren. Unklar ist hierbei jedoch auf welche spezifischen HERV-W Proviren im humanem Genom die beobachteten Proteine zurückgehen. Da zu dem damaligem Zeitpunkt Syncytin-1 das einzige bekannte HERV-W *env* Gen mit der Fähigkeit zur Proteinexpression darstellte (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000), war anzunehmen, dass es sich bei dem detektiertem HERV-W Env Protein um Syncytin-1 handelt. Der formale Beweis hierfür ist jedoch ausstehend. Die für die beobachteten Gag Proteine verantwortlichen HERV-W loci sind unbekannt. Es sollte aber erwähnt werden, dass, übereinstimmend mit der Expression von HERV-W Gag in einer neuronalen Zelllinie, in einer neuropathologischen Untersuchung unter Verwendung des gleichen Antiserums (F45128) eine Expression von HERV-W Gag in Neuronen und Axonen auch in normalem humanem Hirngewebe *in situ* gezeigt werden konnte (Perron et al., 2005).

3.2. Zur Identität von MSRV

Auch wenn verschiedene Befunde mit einer pathogenetischen Relevanz von MSRV/HERV-W bei der MS vereinbar erscheinen, wurde die Thematik bislang insbesondere durch den unklaren Status von MSRV als retroviraler Entität verkompliziert. Die unscharfe Definition von MSRV und die ungeklärte Beziehung zwischen MSRV und HERV-W waren somit ein wesentlicher Ausgangspunkt einer langanhaltenden wissenschaftlichen Debatte über die mögliche Beteiligung von MSRV respektive HERV-W bei der MS (Antony et al., 2007b;

Dolei, 2005; Dolei und Perron, 2009; Garson et al., 2005). In der Tat vertreten manche Autoren die Ansicht, dass MSRV ein infektiöses, Partikel-bildendes, replikationskompetentes Retrovirus darstellt (Dolei, 2005; Dolei und Perron, 2009). Die Konstellation bei MSRV wäre damit vergleichbar mit derjenigen bestimmter Retroviren bei Tieren (z.B. Jaagsiekte Retrovirus bei Schafen), die sowohl in einer exogenen, infektiösen Form (~MSRV) als auch als nicht-infektiöse endogene Retroviren (~HERV-W) vorkommen (Palmarini et al., 2004; Perron et al., 1997). Nachdem jedoch bislang kein Volllängen-, infektiöses, replikationskompetentes MSRV-Genom beschrieben werden konnte, verblieb die Auffassung von MSRV als infektiöses, exogenes Retrovirus unbewiesen (Blomberg et al., 2005; Voisset et al., 2008). Vor diesem Hintergrund war die Aufklärung der Identität von MSRV ein wichtiges gemeinsames Ziel mehrerer der in der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift dargestellten Arbeiten.

3.2.1. Immunantworten gegen MSRV/HERV-W

Sollte es sich bei MSRV um ein exogenes, infektiöses Retrovirus handeln, wäre zu erwarten, dass eine Infektion mit MSRV zu einer Virus-spezifischen Immunantwort im Wirtsorganismus führt, wie dies auch bei Infektionen mit anderweitigen exogenen Retroviren (HTLV-1, HIV). der Fall ist. Umgekehrt kann jedoch auch eine aberrante Expression von endogenen retroviralen Proteinen (z.B. in Tumorgewebe) zu einer Immunreaktion gegen derartige endogene retrovirale Proteine führen (Rakoff-Nahoum et al., 2006; Sauter et al., 1995; Schiavetti et al., 2002). Eine weitere hier beschriebene Arbeit befasste sich daher mit der Frage, ob sich bei Patienten mit MS humorale oder zelluläre Immunreaktionen gegen MSRV/HERV-W nachweisen lassen (Ruprecht et al., 2008b). Hierbei fanden sich lediglich bei einem von 50 Patienten mit MS Antikörper gegen Syncytin-1, darüber hinaus ließen sich weder bei Patienten mit MS noch bei Kontrollen (n = 59) Antikörper gegen Syncytin-1, MSRV Gag oder MSRV Env nachweisen. Auch fanden sich in ELISPOT Untersuchungen weder bei Patienten noch bei Kontrollen zelluläre Immunantworten gegen ein breites Panel von HLA-B7 restringierten MSRV/HERV-W Peptiden. Für die beobachtete Abwesenheit einer humoralen und

zellulären Immunantwort gegen MSR/HERV-W bei Patienten mit MS gibt es im Wesentlichen drei Erklärungsansätze:

1. Die verwandte Methodik war nicht ausreichend sensitiv zum Nachweis von humoralen oder zellulären MSR/HERV-W-spezifischen Immunantworten. Diese Erklärung erscheint jedoch ausgesprochen unwahrscheinlich, nachdem sich mit der in der Untersuchung eingesetzten Methodik in anderweitigen Untersuchungen problemlos humorale Immunantworten gegen HERV-K Proteine (Sauter et al., 1995) bzw. zelluläre Immunantworten gegen EBV Peptide nachweisen ließen (Gronen et al., 2006)
2. Die Abwesenheit von MSR/HERV-W-spezifischen Immunantworten weist auf die Abwesenheit einer Infektion mit MSR bzw. die Abwesenheit einer aberranten Expression von HERV-W Proteinen bei Patienten mit MS hin.
3. Letztlich können die erhobenen Daten allerdings auch dahingehend interpretiert werden, dass eine MSR Infektion oder eine aberrante Expression von HERV-W Proteinen bei Patienten mit MS vorliegen könnte, welche allerdings auf Grund einer immunologischen Toleranz dieser Proteine nicht zu einer Immunantwort führt. Nachdem das HERV-W Env Protein Syncytin-1 ja auch physiologischerweise im menschlichen Organismus in der Plazenta exprimiert wird, ist eine solche Immuntoleranz in der Tat denkbar.

Somit ergibt sich als eine Schlußfolgerung aus dieser Untersuchung, dass serologische Untersuchung bzw. die Analyse von zellulären Immunantworten gegen MSR/HERV-W nicht zum indirekten Nachweis einer Expression von MSR/HERV-W bei der MS eingesetzt werden können. Ein weiteres wichtiges Resultat dieser Arbeit ist zudem, dass, sollte MSR/HERV-W bei der MS eine Rolle spielen, MSR/HERV-W-spezifische humorale oder zelluläre Immunantworten hierbei offenbar keinen relevanten Mechanismus darstellen. Auch wenn die Abwesenheit von Immunantworten gegen MSR eher gegen die Existenz einer „infektiösen MSR-Entität“ bei Patienten mit MS spricht, konnte dieser Punkt jedoch auf Grund der Möglichkeit einer Immuntoleranz von MSR/HERV-W

Proteinen mit dem gewählten experimentellem Ansatz nicht abschließend geklärt werden.

3.2.2. Verpackung von HERV-RNA in retrovirale Partikel

Wie eingangs erwähnt gingen der Identifizierung von MSRV Sequenzen die Beschreibung von RVLPs und reverser Transkriptase Aktivität in Zellkulturüberständen von Patienten mit MS voraus. Nachdem sich daraufhin retrovirale Sequenzen (MSRV) in ultrazentrifugiertem Zellkulturüberstand von Patienten mit MS hatten nachweisen lassen, wurde gefolgert, dass diese retroviralen Sequenzen auch für die initial beschriebenen RVLPs kodieren (Perron et al., 1997). Allerdings liegen keine schlüssigen Beweise dafür vor, dass MSRV Sequenzen tatsächlich in der Lage sind, retrovirale Partikel zu produzieren. Außerdem konnte bislang ebenfalls nicht gezeigt werden, dass eine spezifische Verpackung („packaging“) von MSRV RNA in MSRV Partikel stattfindet.

Als ein Modell, um die Verpackung von endogen retroviraler RNA in RVLPs zu studieren, bedienten wir uns der humanen Keimzelltumorzelllinie Tera-1. Diese in Voruntersuchungen gut charakterisierte Zelllinie produziert spontan von der HERV-K (HML-2) Familie enkodierte RVLPs (Bieda et al., 2001; Boller et al., 1993; Sauter et al., 1995). Als ein wichtiges Ergebnis unserer Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass HERV-K (HML-2) *gag* und *env* RNA Transkripte hochselektiv in HERV-K(HML-2) RVLPs verpackt werden. Nachdem ca. 50 Vollängen HERV-K(HML-2) loci im humanem Genom vorliegen stellte sich die Frage, von welchem dieser loci die in die Partikel verpackten RNA Transkripte produziert werden. Mittels Klonierung und Sequenzierung der verpackten Transkripte wurde gezeigt, dass diese fast ausschließlich von einem bestimmten HERV-K Locus auf Chromosom 22q11.21 abstammen. Bei einer Analyse von transkriptionsaktiven HERV-K loci in Tera-1 Zellen fanden sich insgesamt 8 transkribierte HERV-K loci, wobei innerhalb dieser 8 loci der 22q11.21 locus wiederum der transkriptionell aktivste war. Der HERV-K 22q11.21 locus enthält einen kompletten offenen Leserahmen für ein HERV-K Gag Protein, d.h. dem Protein aus dem die Kapseln

von RVLPS aufgebaut sind. Diese Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis der Biologie der HERV-K (HML-2) Partikelproduktion durch Tera-1 Zellen bei und legen nahe, dass HERV-K (HML-2) RVLPS insbesondere von einem auf Chromosom 22q11.21 HERV-K (HML-2) Provirus produziert werden. Unsere Befunde sprechen ebenfalls dafür, dass innerhalb der HERV-K (HML-2) Familie zumindestens der auf Chromosom 22q11.21 gelegene locus ein funktionelles „packaging signal“ (ψ , eine spezifische Sequenz innerhalb der retroviralen RNA, die für die RNA-Verpackung in Partikel verantwortlich ist) besitzt. Auch wenn die HERV-K (HML-2) Familie vor mindestens 30 Millionen Jahren in das Genom der menschlichen Vorfahren gelangte (Belshaw et al., 2004), ist der molekulare Mechanismus für die RNA-Verpackung in RVLPS bei dem HERV-K 22q11.21 Provirus also offenbar immer noch intakt.

Als ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass auch RNA Transkripte zellulärer „housekeeping“ Gene in HERV-K (HML-2) Partikel mitverpackt werden, ein als „co-packaging“ bezeichnetes Phänomen, das ebenfalls für anderweitige retrovirale Partikel beschrieben wurde (Rulli et al., 2007). Hierbei handelt es sich um einen unselektiven Prozess, da die Effizienz der Verpackung zellulärer „housekeeping“ Gen RNAs in HERV-K (HML-2) Partikel im Vergleich zu HERV-K (HML-2) RNAs mindestens 35-mal niedriger war. Interessanterweise konnten wir aber auch ein unselektives „co-packaging“ von RNA Transkripten von nicht-HERV-K (HML-2) Familien (HERV-W, HERV-H) in HERV-K (HML-2) RVLPS nachweisen. Dies bedeutet, dass in Analogie zu zellulären „housekeeping“ RNAs auch RNAs anderweitiger HERV Familien unspezifisch in HERV-K (HML-2) RVLPS mitverpackt werden. Bezogen auf MSRV ist eine wesentliche Schlussfolgerung aus diesen Befunden, dass die gleichzeitige Detektion von RVLPS und retroviraler RNA in ultrazentrifugierten Zellkulturüberständen nicht zwangsläufig bedeutet, dass die detektierten RNA Sequenzen auch für die entsprechenden RVLPS kodieren. Wir konnten somit experimentell belegen, dass die vormalige Annahme, dass die als „MSRV“ bezeichneten RNA Sequenzen auch für „MSRV-Partikel“ kodieren, sich in dieser Form nicht aufrecht erhalten lässt.

3.2.3. Zum Ursprung von MSRV *env* Sequenzen

Die Aufdeckung des Ursprungs der publizierten MSRV *env* Sequenzen stellt ein zentrales Ergebnis dieser kumulativen Habilitationsschrift dar, nachdem hiermit die Identität von MSRV abschließend geklärt erscheint (Laufer et al., 2009). Wie eingangs erwähnt, wurden die als „MSRV“ *env* bezeichneten RNA Sequenzen aus Plasma bzw. aus aufgereinigten Zellkulturüberständen EBV-transformierter mononukleärer Blutzellen von Patienten mit MS generiert (Komurian-Pradel et al., 1999; Perron et al., 2001). Es handelt sich hierbei um mehrere verschiedene cDNA Klone, die eine hohe Ähnlichkeit zu endogenen HERV-W Sequenzen aufweisen, individuelle HERV-W Proviren, auf die sich MSRV zurückführen lassen könnten, waren bis dato jedoch nicht bekannt. Sollte MSRV (in Analogie zu Jaagsiekte Retrovirus bei Schafen) ein exogenes, replikationskompetentes Mitglied einer endogenen Retrovirus-Familie (HERV-W) sein, und sollte MSRV bei Patienten mit MS eine Rolle spielen, wäre zu erwarten, dass sich MSRV RNA Transkripte spezifisch bei Patienten mit MS nachweisen lassen. Der Nachweis von MSRV *env* Transkripten wird jedoch dadurch verkompliziert, dass endogene HERV-W *env* loci, die ja sehr ähnlich zu MSRV sind, ebenfalls RNA Transkripte produzieren könnten. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in dieser Arbeit welche HERV-W *env* Elemente im humanem Genom in mononukleären Blutzellen von Patienten mit MS transkriptionsaktiv sind und ob sich spezifisch MSRV *env* Sequenzen bei Patienten mit MS detektieren lassen. Die verwendete experimentelle Strategie zur Identifizierung transkriptionsaktiver Klone geht auf Arbeiten von Jens Mayer und Mitarbeitern zurück (Flockerzi et al., 2008; Mayer et al., 2004) und beruht auf dem Einsatz degenerierter PCR-Primer, die eine Vielzahl unterschiedlicher HERV loci amplifizieren können. Nachdem sich unterschiedliche HERV loci innerhalb einer HERV Familie durch wenige aber bestimmte Sequenzvarianten unterscheiden, können nach Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte die erhaltenen cDNA Sequenzen mit Hilfe geeigneter bioinformatischer Methoden (BLAT, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) spezifisch einzelnen genomischen HERV Elementen, basierend auf Sequenzhomologien, zugeordnet werden. Hierdurch lassen sich

somit innerhalb der oft hohen Zahl genomischer loci einer HERV-Familie individuelle transkriptionsaktive loci identifizieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode konnten wir zunächst 7 in humanen mononukleären Blutzellen transkribierte HERV-W *env* loci nachweisen. Ein Vergleich von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen erbrachte hierbei keinen Unterschied im Transkriptionsmuster dieser HERV-W *env* Elemente. Interessanterweise stellten sich fast 30% der 332 analysierten cDNA Klone als *in vitro* Rekombinationen zwischen RNA Transkripten unterschiedlicher HERV-W *env* loci heraus. Das Phänomen solcher *in vitro* Rekombinationen von HERV Sequenzen ist gut beschrieben und beruht insbesondere auf einem „Springen“ („template switch“) der reversen Transkriptase zwischen unterschiedlichen RNA Transkripten während dem Prozess der reversen Transkription (Flockerzi et al., 2007). *In vivo* ist das Springen der reversen Transkriptase ein gewissermaßen physiologischer molekularer Mechanismus von Retroviren zur Erhöhung ihrer genetischen Vielfalt und für die Entstehung neuer Virustypen (Modrow et al., 2003). Es lässt sich spekulieren, dass die in unserer Arbeit beobachtete hohe Rate von *in vitro* rekombinierten HERV-W Sequenzen auf eine besondere Suszeptibilität von endogenen retroviralen RNA Transkripten zur Ausbildung von Rekombinationen während der reversen Transkription *in vitro* zurückgeht.

Vor dem Hintergrund der erhobenen Daten re-analysierten wir im nächsten Schritte systematisch sämtliche bislang publizierte MSR/V *env* Sequenzen und konnten dabei zeigen, dass sich alle bisher publizierte MSR/V *env* Sequenzen entweder auf einzelne bestimmte HERV-W *env* loci im humanem Genom oder aber auf Rekombinationen zwischen RNA-Transkripten verschiedener HERV-W *env* loci zurückführen lassen. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die publizierte MSR/V *gag* Sequenz ebenfalls auf ein bestimmtes auf Chromosom 3q26.32 gelegenes HERV-W Provirus zurückgeht. Da die als „MSR/V *env*“ bezeichneten Sequenzen, in ähnlicher Weise wie die HERV-W *env* Sequenzen in unserer Arbeit, mittels RT-PCR generiert wurden, ist die bei weitem

wahrscheinlichste Erklärung für die rekombinierten MSRV *env* Sequenzen, dass diese gleichermaßen auf einer *in vitro* Rekombination beruhen. Alle HERV-W loci von denen die untersuchten MSRV Sequenzen abstammen sind, z.T. sogar hochgradig, defekt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen somit nachdrücklich dagegen, dass die publizierten MSRV *env* und *gag* Sequenzen auf ein transmissibles, replikationskompetentes, exogenes Retrovirus zurückgehen. Unsere Resultate legen vielmehr nahe, dass bei dem Versuch, ein MS-assoziiertes retrovirales Genom zu identifizieren, tatsächlich RNA-Transkripte von physiologischerweise in humanen mononukleären Blutzellen transkribierten HERV-W loci detektiert wurden. Bei einigen „MSRV“ Sequenzen handelt es sich um rekombinierte Sequenzen von Transkripten unterschiedlicher HERV-W loci, die allerhöchstwahrscheinlich auf eine *in vitro* Rekombination zurückgehen, also im Reaktionsgefäß entstanden sind. Die Auffassung, dass die als „MSRV“ bezeichneten Sequenzen ein exogenes, infektiöses Retrovirus darstellen (Dolei und Perron, 2009; Perron et al., 2000; Serra et al., 2003) lässt sich basierend auf diesen Daten nicht aufrecht erhalten. Das Konzept von MSRV als einem MS-assoziiertem Retrovirus ist damit nicht mehr haltbar und die Bezeichnung „MSRV“ sollte nur noch als quasi historische Bezeichnung verwendet werden. Da jedoch zum Zeitpunkt der Entdeckung der „MSRV“ Sequenzen die HERV-W Familie nicht bekannt bzw. nur unzureichend charakterisiert war, ist es retrospektive nachvollziehbar, dass MSRV Sequenzen initial für eine „neues“ Retrovirus gehalten wurden (Voisset et al., 2008).

Eine wichtige Konsequenz der Ergebnisse dieser Arbeit ist, dass weitere Bestrebungen, die mögliche Rolle von HERV-W bei der MS zu klären, sich gezielt auf einzelne transkriptionsaktive HERV-W loci konzentrieren sollten. In diesem Zusammenhang konnten wir ein auf Chromosom Xq22.3 gelegenes und in mononukleären Blutzellen transkribiertes HERV-W *env* Gen identifizieren, das von besonderem Interesse erscheint. Auch wenn das ERVWE1 Gen, welches für Syncytin-1 kodiert, das einzige HERV-W *env* Gen mit einem komplettem offenem Leserahmen im humanem Genom darstellt (de Parseval et al., 2003), handelt es sich bei dem Xq22.3 HERV-W *env* Gen ebenfalls um ein

Vollängen HERV-W *env* Gen, das lediglich von einem einzigem Stop-Kodon an Aminosäuren-Kodon 39 unterbrochen wird. Weiter stromabwärts enthält es mehrere in-frame Start-Kodone, das erste davon an Kodon 68. Sollte eine Translation beginnend an diesem Start-Kodon möglich sein, könnte das Xq22.3 HERV-W *env* Gen ein 475 Aminosäuren langes N-terminal trunkiertes HERV-W Env Protein produzieren. Interessanterweise stellte sich heraus, dass zwei der bislang als MSR-V *env* titulierten Sequenzen (AF127228 und AF331500) auf den Xq22.3 HERV-W *env* locus zurückgehen. Eine besondere Brisanz bekommt dieser Befund dadurch, dass ein Fragment von AF127228, bestehend aus den Aminosäuren 68-446, zur Herstellung des monoklonalen Anti-HERV-Env Antikörpers 6A2B2 benutzt wurde (Blond et al., 2000). Exakt mit diesem Antikörper konnte in verschiedenen neuropathologischen Arbeiten eine Expression von HERV-W Env in MS Läsion detektiert werden (Antony et al., 2007a; Antony et al., 2004; Mameli et al., 2007). Das zur Generierung von 6A2B2 verwandte Aminosäuren 68-446 Fragment von AF127228 ist bis auf zwei nicht-übereinstimmende Aminosäuren identisch mit der putativen Xq22.3 HERV-W Env Aminosäuresequenz, weist jedoch 38 nicht-übereinstimmende Aminosäuren mit Syncytin-1 auf. Nachdem bis dato Syncytin-1 das einzig bekannte exprimierte HERV-W Env Protein war, wurde allgemein angenommen, dass das von 6A2B2 detektierte Protein Syncytin-1 sei (Antony et al., 2007a; Antony et al., 2004; Blond et al., 2000). Eine wichtige Schlussfolgerung der oben beschriebenen Ergebnisse ist jedoch, dass, sollte der Xq22.3 HERV-W *env* locus in der Lage sein ein Protein zu produzieren, dieses Protein von 6A2B2 erkannt werden müsste, was die Möglichkeit eröffnet, dass das von 6A2B2 in MS-Läsionen detektierte HERV-W Env Protein tatsächlich von Xq22.3 HERV-W *env* abstammt.

3.3. Entdeckung und Charakterisierung eines neuen HERV-W Env Proteins

Auf dem Boden der oben diskutierten Befunde gingen wir in der letzten hier dargestellten Arbeit der Frage nach, ob das Xq22.3 HERV-W *env* Element in der Lage ist, ein HERV-W Env Protein zu produzieren (Roebke et al., 2010). Zu diesem Zweck wurde der Xq22.3 HERV-W *env* locus kloniert und es wurden verschiedene eukaryote Expressionsvektoren

unter der Kontrolle eines Cytomegalievirus-Promotors hergestellt, welche die Xq22.3 HERV-W *env* Sequenz enthalten. Als weitere vergleichende Kontrollen wurden ebenfalls Expressionsvektoren für Syncytin-1 und ein Konstrukt, das die MSRV Env Sequenz AF331500 (eine rekombinierte Sequenz, die größtenteils auf Xq22.3 HERV-W *env* zurückgeht) enthält, verwendet. Eine transiente Transfektion von HeLa Zellen mit den Xq22.3 HERV-W Env Expressionsvektoren resultierte in der Tat in der Expression eines ca. 53 kDa schweren N-terminal trunkierten Xq22.3 HERV-W Env Proteins, das sowohl im western blot als auch immunocytochemisch von den monoklonalen Anti HERV-W Env Antikörpern 6A2B2 und 13H5A5 erkannt wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass der Xq22.3 HERV-W *env* locus die Fähigkeit besitzt, *ex vivo* ein N-terminal trunkiertes HERV-W Env Protein zu produzieren. Auf Grund seiner N-terminalen Trunkierung wurde dieses Protein N-Trenv (N-terminally truncated Env) benannt. Es konnte somit zusätzlich zu ERVWE1 ein zweites HERV-W *env* Gen mit der Fähigkeit zur Proteinexpression im humanem Genom identifiziert werden. In Analogie zu dem ERVWE1 Gen, welches für Syncytin-1 kodiert, wurde für den Xq22.3 HERV-W *env* locus der Gename ERVWE2 vorgeschlagen.

Wie erwähnt, ist der Xq22.3 HERV-W *env* ORF lediglich durch ein einziges vorzeitiges Stop-Kodon an Kodon Position 39 unterbrochen. Es stellte sich somit die Frage, ob sich durch Reversion dieses Stop-Kodons ein Vollängen HERV-W Env rekonstituieren lässt. Hierfür wurde das Stop Kodon an Position 39 (TGA) des Xq22.3 HERV-W *env* ORF durch Austausch eines Nukleotids in ein Tryptophan Kodon (TGG) mutiert und dieses Konstrukt wiederum in einen eukaryoten Expressionsvektor kloniert. Nach Transfektion dieses Konstruktes in HeLa Zellen kam es zur Expression eines ca. 75 kDa schweren, kompletten, Vollängen Xq22.3 HERV-W Env Proteins. Dies bedeutet, dass durch Mutation eines einzigen Nukleotids ein im Laufe der Evolution defekt gewordenes HERV-W *env* Gen quasi wieder „reanimiert“ und in die Lage versetzt werden konnte ein komplettes Env Protein zu produzieren. Es sollte erwähnt werden, dass es mit ähnlichen Strategien bereits gelungen war für die HERV-K(HML-2) Familie sogar ein komplettes, infektiöses,

replikationskompetentes virales Genom zu rekonstituieren, gewissermaßen also den infektiösen Vorläufer der aktuell im humanem Genom befindlichen defekten HERV-K(HML-2) Kopien „wiederauferstehen“ zu lassen (Dewannieux et al., 2006; Lee und Bieniasz, 2007).

Eine interessante Frage war nun welche Eigenschaften N-Trenv und das Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Protein aufweisen. Während sich N-Trenv als ein unglykosyliertes und intrazellulär lokalisiertes Protein erwies, das keine Oligomere bildet, konnte nachgewiesen werden, dass das Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Protein glykosyliert ist, auf der Zelloberfläche exprimiert wird und Oligomere ausbildet. Das Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Protein besitzt damit, ähnlich wie Syncytin-1 (Cheynet et al., 2005), typische Eigenschaften eines retroviralen Env Proteins. Nachdem N-Trenv diese Eigenschaften nicht aufweist, ist zu vermuten, dass sich N-Trenv auch in funktioneller Hinsicht deutlich von Volllänge Env Proteinen unterscheidet, wobei mögliche Funktionen von N-Trenv aktuell unbekannt sind. Wahrscheinlichste Ursache für die unterschiedlichen Eigenschaften von N-Trenv und dem Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Protein ist das Fehlen des N-terminalen Signalpeptides auf Grund der N-terminalen Trunkierung von N-Trenv. Bei Volllänge retroviralen Env Proteinen ist das Signalpeptid (eine Sequenz von ca. 20 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins), wie bei anderen Membranproteinen auch, für das „targeting“ der Translation an das endoplasmatische Retikulum verantwortlich (Ruggieri et al., 2009). Nachdem N-Trenv kein Signalpeptid besitzt wird es aller Wahrscheinlichkeit nach jedoch an freien Ribosomen synthetisiert.

Die Tatsache, dass ein einziger Nukleotidaustausch in Xq22.3 HERV-W *env* grundlegende Änderungen der Eigenschaften des Xq22.3 HERV-W Env Proteins nach sich zieht, gibt zu Spekulationen Anlass, inwiefern Mutationen im Bereich des Stop-Kodons an Position 39 des Xq22.3 HERV-W *env* Gens zu einer Rekonstitution eines Volllänge Xq22.3 HERV-W Env Proteins *in vivo* mit möglichen funktionellen Konsequenzen führen könnten. Bislang

wurden jedoch keine Mutationen im Bereich des Stop-Kodons an Position 39 des Xq22.3 HERV-W *env* Gens beschrieben.

Abschließend stellt sich die wichtige Frage einer Expression von N-Trenv *in vivo*. Diesbezüglich konnten wir in eigenen immunhistochemischen Untersuchungen bereits veröffentlichte Befunde erneut bestätigen und zeigen, dass der monoklonale Anti HERV-W Env Antikörper 6A2B2 sowohl ein in humanem Plazentagewebe (Blond et al., 2000) als auch in akuten MS-Läsionen (Antony et al., 2007a; Antony et al., 2004; Mameli et al., 2007) exprimiertes Antigen detektiert. Dieses Antigen war in einer akuten MS-Läsion in aktivierten Mikrogliazellen/Makrophagen, mononukleären Zellen und Endothelzellen nachweisbar. In unseren Händen detektierte 6A2B2 im western blot und in der Immunocytochemie transient exprimiertes N-Trenv, nicht aber Syncytin-1. Diese Befunde stehen im Einklang mit der bereits erwähnten Tatsache, dass die Aminosäuresequenz gegen die 6A2B2 gerichtet ist nur 2 mismatches mit Xq22.3 HERV-W Env, jedoch 38 nicht-übereinstimmende Aminosäuren mit Syncytin-1 aufweist. Darüber hinaus zeigte sich in Doppelfärbungen von Plazentagewebe mit 6A2B2 und einem polyklonalem Anti-Syncytin-1 Serum eine unterschiedliche Lokalisation der detektierten Antigene. Insgesamt stellen diese Daten starke Argumente dafür dar, dass es sich bei dem von 6A2B2 *in vivo* detektiertem Antigen nicht um Syncytin-1, sondern um ein anderweitiges HERV-W Env Protein, i.e. N-Trenv, handeln könnte. Grundsätzlich ist es methodisch jedoch ausgesprochen schwierig definitiv zu klären, von welcher der oft zahlreichen genomischen Kopien innerhalb einer HERV-Familie ein exprimiertes HERV Protein abstammt. Letztlich wäre es hierfür notwendig die Aminosäuresequenz eines exprimierten HERV-Proteins zu bestimmen und diese daraufhin auf Grund spezifischer Aminosäuremotive einem bestimmten chromosomalem HERV Genlocus zuzuordnen, ähnlich der oben beschriebenen Methodik zur Zuordnung von HERV mRNA Transkripten. De facto konnte ein solcher Beweis bislang für kein einziges exprimiertes HERV Protein (auch nicht für Syncytin-1) geführt werden. Zusammenfassend sind unsere Daten, auch

wenn sie diese nicht formal beweisen, vereinbar mit einer *in vivo* Expression von N-Trenv.

Bisherige Untersuchungen zu im menschlichem Organismus exprimierten endogen retroviralen Proteinen konzentrierten sich insbesondere auf diejenigen HERV Elemente im humanem Genom mit einem ununterbrochenem offenem Leserahmen für komplette retrovirale Proteine (de Parseval und Heidmann, 2005; Ruprecht et al., 2008c). Es gibt jedoch einzelne Beispiele, die dafür sprechen, dass auch von defekten HERV loci abstammende z.T. stark verkürzte Proteine eine biologische Funktion haben könnten (Schiavetti et al., 2002). Eine weitere wichtige Schlussfolgerung dieser Untersuchung ist, dass auch die im Vergleich zu HERV loci mit kompletten offenen Leserahmen zahlenmäßig sehr viel häufigeren HERV loci mit defekten oder trunkierten offenen Leserahmen öfters als bisher vermutet in der Lage sein könnten, Fragmente von HERV Proteinen zu produzieren, die eine physiologische oder pathologische Rolle im humanem Organismus spielen könnten.

3.4. MSRV/HERV-W und MS – Aktueller Stand

Die bisherige Entwicklung und der aktuelle Kenntnisstand zur möglichen Rolle von MSRV/HERV-W bei der MS lässt sich abschließend folgendermaßen kurz zusammenfassen: Bei dem in den 1990er Jahren unternommenem Versuch, ein MS-assoziiertes Retrovirus (MSRV) zu identifizieren, wurde, gemäß der hier dargestellten Ergebnisse, kein infektiöses, replikationskompetentes, exogenes, „neues“ Retrovirus im Sinne eines putativen „MS-Erregers“ entdeckt. Allerdings führte die Beschreibung von RVLPS, reverser Transkriptase Aktivität und später auch retroviralen Sequenzen bei Patienten mit MS letztlich zur Entdeckung einer neuen HERV Familie, HERV-W. Interessanterweise könnte einem von dieser Familie enkodiertem Env Protein in der Tat eine mögliche pathogenetische Relevanz bei der MS zukommen. Insbesondere zeigte sich in neuropathologischen Untersuchungen die Expression eines HERV-W Env Proteins in akuten MS Läsionen. Darüber hinaus legen funktionelle Untersuchungen mit dem

Vollängen HERV-W Env Protein Syncytin-1 nahe, dass dieses Protein einen Untergang von Oligodendrozyten mit konsekutiver Demyelinisierung bewirken kann. Während bislang davon ausgegangen wurde, dass Syncytin-1 (Genname: ERVWE1) das einzige von der HERV-W Familie produzierte Env Protein und somit auch das in MS-Läsionen exprimierte HERV-W Env Protein darstellt, konnten wir einen HERV-W *env* locus auf Chromosom Xq22.3 identifizieren (Genname: ERVWE2), der in der Lage ist, ein N-terminal trunkiertes HERV-W Env Protein (Proteinname: N-Trenv) *ex vivo* zu produzieren. Unsere Daten sind vereinbar mit der Auffassung, dass dieses Protein auch *in vivo* exprimiert werden könnte und es sich bei dem in MS Läsionen nachweisbarem HERV-W Env Protein um N-Trenv handeln könnte. Zukünftige Untersuchungen sollten die exakte Identität des in MS-Läsionen exprimierten HERV-W Env Proteins genauer klären um davon ausgehend die mögliche pathogenetische Relevanz dieses Proteins bei der MS weiter untersuchen zu können.

4. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Auch wenn die Ätiologie der MS unverstanden ist, sprechen zahlreiche Befunde dafür, dass die MS auf dem Boden einer komplexen Interaktion von genetischen und Umweltfaktoren entsteht. Als ein möglicherweise bei der MS relevanter Umweltfaktor wurde in den 1990er Jahren, ausgehend von in Zellkulturüberständen und Plasma von Patienten mit MS nachgewiesenen retroviralen RNA Sequenzen, ein MS-assoziiertes Retrovirus (MSRV) beschrieben. In der Folge stellte sich heraus, dass MSRV Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu einer Familie humaner endogener Retroviren (HERV), HERV-W, haben. HERVs sind Relikte von im Laufe der Evolution stattgehabten Keimbahninfektionen durch exogene Retroviren, die sich stabil in das humane Genom integriert haben. Verschiedene Arbeiten legten sowohl eine mögliche Rolle eines putativen MSRV Envelope (Env) Proteins als auch eines Volllängen HERV-W Env Proteins (Syncytin-1) bei der MS nahe. Insbesondere konnte in immunhistologischen Untersuchungen die Expression eines HERV-W Env Proteins in akuten MS-Läsionen nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift verschiedene Kernfragen zu MSRV/HERV-W und deren möglicher Bedeutung für die MS in Originalarbeiten untersucht.

Zunächst wurde die Regulation der Expression von HERV-W Proteinen durch anderweitige virale Erreger am Beispiel des Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) analysiert, wobei gezeigt werden konnte, dass eine Infektion mit HSV-1 u.a. zu einer Induktion eines HERV-W Env Proteins in neuronalen und endothelialen Zellkulturen führt. Nachdem für das HERV-W Env Protein Syncytin-1 oligodendrotoxische und proinflammatorische Eigenschaften beschrieben wurden, könnte eine Heraufregulation dieses Proteins durch HSV-1, oder auch anderweitige virale Erreger, eine für die MS relevante Rolle spielen.

Das genaue Verhältnis von MSRV und HERV-W sowie der Status von MSRV als retroviraler Entität waren bislang ungeklärt, insofern war ein zentrales Thema der hier

dargestellten Arbeiten die Aufklärung der Identität von MSRV. Sollte es sich bei MSRV um ein infektiöses, exogenes Retrovirus handeln, wäre zu erwarten, dass sich bei infizierten Individuen eine Immunantwort gegen MSRV findet. In einer diesbezüglichen Untersuchung zeigte sich jedoch, dass weder Patienten mit MS noch Kontrollen relevante humorale oder zelluläre Immunantworten gegen MSRV/HERV-W Proteine aufweisen.

In einer weiteren Arbeit wurde an Hand der humanen Keinzelltumor-Zelllinie Tera-1, welche von der HERV-K (HML2) Familie enkodierte retrovirale Partikel produziert, die Verpackung von HERV Transkripten in retrovirale Partikel studiert. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung konnte geschlossen werden, dass die vormalige Annahme, dass die als „MSRV“ bezeichneten RNA Sequenzen auch für „MSRV-Partikel“ kodieren, sich in dieser Form nicht aufrecht erhalten lässt.

Zusätzlich wurde die zentrale Frage des Ursprungs der publizierten MSRV *env* Sequenzen durch eine systematische Analyse transkribierter HERV-W *env* loci sowie publizierter MSRV *env* Sequenzen bearbeitet. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass sämtliche publizierten MSRV *env* Sequenzen sich auf Transkripte verschiedener genomischer HERV-W loci bzw. *in vitro* Rekombinationen unterschiedlicher HERV-W Transkripte zurückführen lassen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte ein auf Chromosom Xq22.3 gelegener transkribierter HERV-W *env* locus identifiziert werden, der nach einem einzigem vorzeitigem N-terminalem Stop-Codon einen langen offenen Leserahmen für ein 475 Aminosäuren langes N-terminal trunkiertes HERV-W Env Protein besitzt. In einer weiteren Arbeit konnte abschließend gezeigt werden, dass der Xq22.3 HERV-W *env* locus (ERVWE2) in der Lage ist, *ex vivo* ein N-terminal trunkiertes HERV-W Env Protein (N-Trenv) zu produzieren. Durch Reversion des vorzeitigen Stop-Kodons in Xq22.3 HERV-W *env* konnte zudem ein Vollängen Xq22.3 HERV-W Env Protein rekonstituiert und dessen Eigenschaften im Vergleich zu N-Trenv charakterisiert werden. Die Ergebnisse zusätzlich

durchgeführter immunhistochemischer Untersuchungen sind vereinbar mit einer Expression von Xq22.3 HERV-W Env in MS-Läsionen *in vivo*.

Zusammenfassend sprechen die hier dargestellten Befunde klar gegen die Annahme, dass es sich bei MSRV um ein infektiöses, replikationskompletentes, exogenes Retrovirus, im Sinne eines „MS-Erregers“ handelt. Auf der anderen Seite liegen jedoch Hinweise dafür vor, dass einzelne HERV-W Proteine eine pathophysiologisch relevante Rolle bei der MS spielen könnten. In diesem Zusammenhang konnte ein HERV-W *env* Gen (ERVWE2) charakterisiert werden, das die Fähigkeit zur Expression eines neu entdeckten HERV-W Env Proteins (N-Trenv) besitzt. Unsere Daten sind vereinbar mit der Auffassung, dass es sich bei dem in MS-Läsionen exprimiertem Protein um N-Trenv handeln könnte. Die exakte Identität des in MS-Läsionen exprimierten HERV-W Env Proteins sollte in zukünftigen Untersuchungen genauer geklärt werden um davon ausgehend die mögliche pathophysiologische Relevanz dieses Proteins bei der MS weiter untersuchen zu können.

5. Literaturverzeichnis

- Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, Warren KG, et al. The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *J Immunol* 2007a; 179: 1210-24.
- Antony JM, Izad M, Bar-Or A, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F, et al. Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 1253-9.
- Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1088-95.
- Antony JM, Zhu Y, Izad M, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F, et al. Comparative expression of human endogenous retrovirus-W genes in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007b; 23: 1251-6.
- Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 Suppl 2: 14572-9.
- Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Paces J, Burt A, et al. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4894-9.
- Bieda K, Hoffmann A, Boller K. Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol* 2001; 82: 591-6.
- Blomberg J, Ushameckis D, Jern P. Evolutionary aspects of human endogenous retroviral sequences (HERVs) and disease. In: Sverdlov ED, editor. *Retroviruses and primate genome evolution*: Eureka.com, 2005: 204-238.
- Blond J-L, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, et al. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J. Virol* 1999; 73: 1175-1185.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, et al. 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.* 2000; 74: 3321-3329.
- Boeke JD, Stoye JP. Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE, editors. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997: 343-435.
- Boller K, Konig H, Sauter M, Mueller-Lantsch N, Lower R, Lower J, et al. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* 1993; 196: 349-53.
- Boller K, Schonfeld K, Lischer S, Fischer N, Hoffmann A, Kurth R, et al. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol* 2008; 89: 567-572.
- Cheyne V, Ruggieri A, Oriol G, Blond JL, Boson B, Vachot L, et al. Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *J Virol* 2005; 79: 5585-93.
- Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 2005; 15: 179-211.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502-17.
- de Parseval N, Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res* 2005; 110: 318-332.
- de Parseval N, Lazar V, Casella JF, Benit L, Heidmann T. Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *J Virol* 2003; 77: 10414-22.

- Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, et al. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res* 2006; 16: 1548-56.
- Dolei A. MSRV/HERV-W/syncytin and its linkage to multiple sclerosis: the usability and the hazard of a human endogenous retrovirus. *J Neurovirol* 2005; 11: 232-5.
- Dolei A, Perron H. The multiple sclerosis-associated retrovirus and its HERV-W endogenous family: a biological interface between virology, genetics, and immunology in human physiology and disease. *J Neurovirol* 2009; 15(1): 4-13.
- Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, Cirotto MC, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology* 2002; 58: 471-3.
- Douville R, Liu J, Rothstein J, Nath A. Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 69: 141-51.
- Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 268-77.
- Ehrlich GD, Glaser JB, Bryz-Gornia V, Maese J, Waldmann TA, Poiesz BJ, et al. Multiple sclerosis, retroviruses, and PCR. The HTLV-MS Working Group. *Neurology* 1991; 41: 335-43.
- Flockerzi A, Maydt J, Frank O, Ruggieri A, Maldener E, Seifarth W, et al. Expression pattern analysis of transcribed HERV sequences is complicated by ex vivo recombination. *Retrovirology* 2007; 4: 39.
- Flockerzi A, Ruggieri A, Frank O, Sauter M, Maldener E, Kopper B, et al. Expression patterns of transcribed human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) loci in human tissues and the need for a HERV Transcriptome Project. *BMC Genomics* 2008; 9: 354.
- Fugger L, Morling N, Ryder LP, Sandberg-Wollheim M, Svejgaard A. Failure to demonstrate human T cell lymphotropic virus type I in multiple sclerosis patients. *J Gen Virol* 1990; 71 (Pt 5): 1103-7.
- Garson J, Creange A, Dolei A, Ferrante P, Jouvin-Marche E, Marche PN, et al. MSRV, Syncytin and the role of endogenous retroviral proteins in demyelination. *Mult Scler* 2005; 11: 249-50.
- Garson JA, Tuke PW, Giraud G, Paranhos-Baccala G, Perron H. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 351: 33.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calendar A, et al. Antibodies to HTLV-1 in patients with tropical spastic paraparesis. *The Lancet* 1985; 2: 407-410.
- Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One* 2009; 4: e4565.
- Greenberg SJ, Ehrlich GD, Abbott MA, Hurwitz BJ, Waldmann TA, Poiesz BJ. Detection of sequences homologous to human retroviral DNA in multiple sclerosis by gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2878-82.
- Gronen F, Ruprecht K, Weissbrich B, Klinker E, Kroner A, Hofstetter H, et al. Frequency analysis of HLA-B7-restricted Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with multiple sclerosis and healthy controls. *J Neuroimmunol* 2006; 180: 185-192.
- Haahr S, Sommerlund M, Moller-Larsen A, Mogensen S, Andersen HM. Is multiple sclerosis caused by a dual infection with retrovirus and Epstein-Barr virus? *Neuroepidemiology* 1992; 11: 299-303.
- Karlsson H, Bachmann S, Schröder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH. Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *PNAS* 2001; 98: 4634-4639.
- Karlsson H, Schroder J, Bachmann S, Bottmer C, Yolken RH. HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 12-3.
- Katzourakis A, Tristem M. Phylogeny of human endogenous and exogenous retroviruses. In: Sverdlov ED, editor. *Retroviruses and primate genome evolution*. Georgetown, Tex: Landes Bioscience, 2005: 186-203.

- Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, et al. Molecular cloning and characterization of MSR-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology* 1999; 260: 1-9.
- Koprowski H, DeFreitas EC, Harper ME, Sandberg-Wollheim M, Sheremata WA, Robert-Guroff M, et al. Multiple sclerosis and human T-cell lymphotropic retroviruses. *Nature* 1985; 318: 154-60.
- Lamprecht B, Walter K, Kreher S, Kumar R, Hummel M, Lenze D, et al. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med* 2010; 16: 571-9, 1p following 579.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantsch N, Ruprecht K. Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology* 2009; 6: 37.
- Lee WJ, Kwun HJ, Kim HS, Jang KL. Activation of the human endogenous retrovirus W long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein 1. *Mol Cells* 2003; 15: 75-80.
- Lee YN, Bieniasz PD. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog* 2007; 3: e10.
- Lucchinetti CF, Brueck W, Rodriguez M, Lassmann H. Multiple sclerosis: lessons from neuropathology. *Semin Neurol* 1998; 18: 337-49.
- Mallet F, Bouton O, Prudhomme S, Cheynet V, Oriol G, Bonnaud B, et al. The endogenous retroviral locus ERVWE1 is a bona fide gene involved in hominoid placental physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1731-6.
- Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, et al. 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* 2007; 88: 264-274.
- Mayer J, Ehlhardt S, Seifert M, Sauter M, Muller-Lantsch N, Mehraein Y, et al. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) proviruses with Rec protein coding capacity and transcriptional activity. *Virology* 2004; 322: 190-8.
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000; 403: 785-789.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie*. Heidelberg u. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- Nakagawa K, Harrison LC. The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity. *Immunol Rev* 1996; 152: 193-236.
- Nellaker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H. Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology* 2006; 3: 44.
- Nowak J, Januszkiewicz D, Pernak M, Liwen I, Zawada M, Rembowska J, et al. 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* 2003; 9: 112-7.
- Palmarini M, Mura M, Spencer TE. Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation. *J Gen Virol* 2004; 85: 1-13.
- Pavlicek A, Paces J, Elleder D, Hejnar J. Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution. *Genome Res* 2002; 12: 391-399.
- Perron H. Microbial agents triggering endogenous retroviruses within genetic susceptibility loci resulting in expression of superantigen and gliotoxic molecules: a plausible 'immunovirogenetic' cascade causing multiple sclerosis? *Mod Asp Immunobiol* 2001; 1: 198-203.
- Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7583-7588.

- Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Research in Virology* 1989; 140: 551-561.
- Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, et al. Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 2001; 287: 321-32.
- Perron H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Genoulaz O, Geny C, et al. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1991; 337: 862-863.
- Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V, et al. Human endogenous retrovirus (HERV)-W env and gag proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol* 2005; 11: 23-33.
- Perron H, Perin J-P, Rieger F, Alliel PM. Particle-associated retroviral RNA and tandem RGH/HERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis? *J Neurovirol* 2000; 6: S67-S75.
- Perron H, Suh H, Lalande B, Gratacap B, Laurent A, Stoebner P, et al. 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.* 1993; 74: 65-72.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. 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* 1980; 77: 7415-9.
- Rakoff-Nahoum S, Kuebler PJ, Heymann JJ, Sheehy ME, Ortiz GM, Ogg GS, et al. Detection of T lymphocytes specific for human endogenous retrovirus K (HERV-K) in patients with seminoma. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 52-56.
- Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9: 727-39.
- Reddy EP, Sandberg-Wollheim M, Mettus RV, Ray PE, DeFreitas E, Koprowski H. Amplification and molecular cloning of HTLV-I sequences from DNA of multiple sclerosis patients. *Science* 1989; 243: 529-33.
- Rieckmann P, Toyka K. Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. In: Diener HC, Putzki N and Berlit P, editors. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag, 2005: 298-316.
- Robert-Guroff M, Nakao Y, Notake K, Ito Y, Sliski A, Gallo RC. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T cell leukemia. *Science* 1982; 215: 975-8.
- Roebke C, Wahl S, Laufer G, Stadelmann C, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, et al. An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3. *Retrovirology* 2010; 7: 69.
- Rolland A, Jouvin-Marche E, Saresella M, Ferrante P, Cavaretta R, Creange A, et al. Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSR (Multiple Sclerosis associated RetroViral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 160: 195-203.
- Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol* 2006; 176: 7636-44.
- Ruggieri A, Maldener E, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Meese E, Fackler OT, et al. Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) encodes a stable signal peptide with biological properties distinct from Rec. *Retrovirology* 2009; 6: 17.
- Rulli SJ, Hibbert CS, Mirro J, Pederson T, Biswal S, Rein A. Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J Virol* 2007; 81: 6623-6631.
- Ruprecht K, Ferreira H, Flockerzi A, Wahl S, Sauter M, Mayer J, et al. Human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2) RNA transcripts are selectively packaged into retroviral particles produced by the human germ cell tumor line Tera-1 and

- originate mainly from a provirus on chromosome 22q11.21. *J Virol* 2008a; 82: 10008-16.
- Ruprecht K, Gronen F, Sauter M, Best B, Rieckmann P, Mueller-Lantsch N. Lack of immune responses against multiple sclerosis-associated retrovirus/human endogenous retrovirus W in patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol* 2008b; 14: 143-51.
- Ruprecht K, Mayer J, Sauter M, Roemer K, Mueller-Lantsch N. Endogenous retroviruses and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2008c; 65: 3366-3382.
- Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, Gronen F, Kim KS, Perron H, et al. Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J. Neurovirol.* 2006; 12: 65-71.
- Ruprecht K, Perron H. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2005; 293: 2089; author reply 2089-90.
- Sauter M, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dolken G, Lemm I, et al. Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* 1995; 69: 414-21.
- Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, Boon T, Coulie PG. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 2002; 62: 5510-6.
- Serra C, Mameli G, Arru G, Sotgiu S, Rosati G, Dolei A. In vitro modulation of the multiple sclerosis (MS)-associated retrovirus by cytokines: implications for MS pathogenesis. *J Neurovirol* 2003; 9: 637-43.
- Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 2001; 22: 171-173.
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 2001; 15: 579-89.
- Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, Huber BT, et al. Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: 1175-80.
- Tonjes RR, Boller K, Limbach C, Lugert R, Kurth R. Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology* 1997; 233: 280-91.
- Tuke PW, Perron H, Bedin F, Beseme F, Garson JA. Development of a pan-retrovirus detection system for multiple sclerosis studies. *Acta Neurol Scand Suppl* 1997; 169: 16-21.
- Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccala G. Phylogeny of a novel family of human endogenous retrovirus sequences, HERV-W, in humans and other primates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1529-1533.
- Voisset C, Bouton O, Bedin F, Duret L, Mandrand B, Mallet F, et al. Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 731-740.
- Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ. Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 157-96.
- Wiendl H, Toyka KV, Rieckmann P, Gold R, Hartung HP, Hohlfeld R. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J Neurol* 2008; 255: 1449-63.

6. Danksagung

Verschiedene Mentoren haben meinen wissenschaftlichen und klinischen Werdegang begleitet, befördert und unterstützt und damit die Entstehung von weiten Teilen dieser Arbeit erst ermöglicht.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Peter Rieckmann bedanken für die sehr konstruktive, anregende und liberale Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, seine ausgesprochen großzügige Unterstützung und seinen hervorragenden Einsatz in der wissenschaftlichen und klinischen Ausbildung, die er mir zukommen ließ.

Herrn Prof. Klaus Toyka, ehem. Direktor der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für das, speziell auch im Bereich Neuroimmunologie, stimulierende und anspornende Klima an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg.

Herrn Prof. Jürgen Schneider-Schauliess Institut für Virologie, Julius-Maximilians Universität Würzburg, danke ich für die Einführung in die Virologie und die großzügige Förderung während der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe.

Bei Hervé Perron, PhD, möchte ich mich bedanken für eine langjährige wissenschaftliche Kooperation, zahlreiche kritische Diskussionen und die Hinführung auf das Gebiet der Retrovirologie.

Herrn Prof. Nikolaus Müller-Lantzsch und Frau Dr. Marlies Sauter, Institut für Virologie, Universität des Saarlandes, danke ich herzlich für die wohlwollende Unterstützung sowie die positive, offene und inspirierende Arbeitsatmosphäre an Ihrem Institut. Bei Ihnen sowie Herrn PD Dr. Jens Mayer, Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes, möchte ich mich insbesondere auch bedanken für die fundierte Einarbeitung, fruchtbare

Zusammenarbeit und unermüdliche Hilfe bei der wissenschaftlichen Arbeit zu humanen endogenen Retroviren.

Herrn Prof. Matthias Endres danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung, sowie das wissenschaftsfreundliche Klima an der Neurologischen Klinik, Charite – Universitätsmedizin Berlin.

Zahlreiche Doktorandinnen und Doktoranden, Diplomandinnen und Diplomanden, wissenschaftliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, sowie medizinisch-technische Assistentinnen waren an der Entstehung der hier zusammengefassten Arbeiten beteiligt. Ihnen allen danke ich für die geleistete Arbeit und ihr großes Engagement.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für beständigen Rückhalt und fortwährende Unterstützung.

Danken möchte ich aber vor allem meiner Frau und meiner Tochter, die mich stets liebevoll begleitet haben und mir mit Rat, Geduld und Zuspruch zur Seite stehen.

7. Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin, den 28. Februar 2011

Dr. Klemens Ruprecht